

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Sledování změn exprese VCAM-1 v experimentální aterogenezi.

The study of VCAM-1 expression in experimental atherogenesis.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Veronika Mertlíková

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

„Děkuji Doc. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, nejen za odborné vedení, ale i za vstřícný a trpělivý přístup.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Veronika Mertlíková

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal Ph.D.

Název diplomové práce: Sledování změn exprese VCAM-1 v experimentální atherogenezi.

Cílem práce bylo popsat expresi VCAM-1 ve stěně cévy u normocholesterolemických myší kmene C57BL/6J, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta a u hypercholesterolemických apoE-deficientních myší.

Jako experimentální model jsme použili samce normocholesterolemického myšího kmene C57BL/6J a apoE-deficientní myši ve věku 6 týdnů. Samci myšího kmene C57BL/6J byli krmeni standardní laboratorní dietou a apoE-deficientní myši cholesterolovou dietou po dobu 8 týdnů. Poté byla provedena biochemická analýza vzorků krve a imunohistochemická analýza odebraných segmentů aortálního sinu a aortálního oblouku.

V porovnání s kontrolním kmenem myší C57BL/6J byla u apoE-deficientních myší nalezena vysoká hladina cholesterolu v krvi. Aterosklerotické pláty vyvíjí pouze tyto hypercholesterolemické myši. Pomocí imunohistochemických metod jsme sledovali expresi VCAM-1 v aortě u C57BL/6J myší, kde nebyly přítomny aterosklerotické pláty, dále u apoE-deficientních myší v místech bez plátů a v oblasti plátů. V oblastech bez lézí byla exprese VCAM-1 detekována pouze na cévním endotelu aorty jak u C57BL/6J, tak i u apoE-deficientních myší. U apoE-deficientních myší s aterosklerotickými pláty došlo ke změnám v expresi VCAM-1 ve stěně cévy. Kromě exprese na cévním endotelu plátu i mimo něj byla exprese pozorována také v medii cév modifikovanými hladkými svalovými buňkami. Výsledky této práce ukazují na změny exprese VCAM-1 během atherogeneze z hlediska lokalizace v cévní stěně.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Veronika Mertlíková
Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal Ph.D.
Title of diploma thesis: The study of VCAM-1 expression in experimental atherogenesis.

The aim of the thesis is to describe the expression of VCAM-1 in the vessel wall of normocholesterolemic C57BL/6J mice, which were fed standard laboratory diet, and hypercholesterolemic apoE-deficient mice.

As an experimental model normocholesterolemic C57BL/6J male mice and apoE-deficient mice at the age of 6 weeks were used. The C57BL/6J male mice were fed standard laboratory diet and apoE-deficient mice were fed cholesterol diet for 8 weeks. After this procedure a biochemical analysis of blood and immunohistochemical analysis of segments taken from aortic sinus and aortal arch were made.

In comparison with the control C57BL/6J mice a large level of cholesterol was found in the blood of the apoE-deficient mice. Atherosclerotic lesions are thus generated only by the hypercholesterolemic mice. We were monitoring the expression of VCAM-1 in aortas of the normocholesterolemic C57BL/6J mice without atherosclerotic lesions by immunohistochemical methods, and the same methods were used for monitoring of the areas with and without the lesions of the apoE-deficient mice. The expression of VCAM-1 was detected only on the aortic vessel endothelium of the areas with no lesions at the C57BL/6J and also at the apoE-deficient mice. The apoE-deficient mice with the atherosclerotic lesions, underwent some changes in the expression of VCAM-1 in the vessel wall. Beside the expression on the vessel endothelium of the lesion and beyond it, the expression was monitored also in the vessel media of the vessels. There the VCAM-1 is expressed by the modified smooth muscle cells. The results of this work indicate changes in the expression of VCAM-1 during atherogenesis in terms of localization in the vessel wall.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
OBSAH.....	6
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	9
2.1.1 <i>Obecná struktura cév</i>	<i>9</i>
2.1.2 <i>Srovnání artérií a vén</i>	<i>9</i>
2.1.3 <i>Artérie</i>	<i>10</i>
2.1.4 <i>Kapiláry</i>	<i>11</i>
2.1.5 <i>Vény</i>	<i>12</i>
2.2 ATEROSKLERÓZA	13
2.2.1 <i>Epidemiologie.....</i>	<i>14</i>
2.2.2 <i>Rizikové faktory.....</i>	<i>14</i>
2.2.3 <i>Patogeneze aterosklerózy.....</i>	<i>15</i>
2.3 BUNĚČNÉ ADHEZNÍ MOLEKULY	22
2.3.1 <i>Typy adhezních molekul.....</i>	<i>22</i>
2.3.2 <i>Struktura VCAM-1</i>	<i>28</i>
2.3.3 <i>Exprese VCAM-1 endotelovými buňkami.....</i>	<i>29</i>
2.3.4 <i>Exprese VCAM-1 hladkými svalovými buňkami</i>	<i>31</i>
2.3.5 <i>Možnosti snížení exprese VCAM-1</i>	<i>35</i>
2.4 MYŠÍ MODEL	36
2.4.1 <i>ApoE deficientní myši.....</i>	<i>37</i>
2.4.2 <i>LDL-receptor deficientní myši</i>	<i>38</i>
2.4.3 <i>ApoE a LDL-receptor double knockout myši</i>	<i>38</i>
3 ZADÁNÍ A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	39
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40

4.1	ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA.....	40
4.2	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	40
4.3	IMUNOHISTOCHEMIE	40
4.3.1	<i>Pracovní postup</i>	41
4.4	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	42
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	43
5.2	IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V AORTĚ	43
6	DISKUZE	48
7	ZÁVĚR	50
8	SEZNAM ZKRATEK.....	51
9	POUŽITÁ LITERATURA	52

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou podle dat získaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR nejčastější příčinou úmrtí v České republice. V roce 2010 zemřelo v důsledku KVO 53 590 osob, což představovalo 50,2% z celkové mortality. Od roku 1990 sledujeme pokles kardiovaskulární morbidity a mortality u obou pohlaví (1).

Nejvyšší podíl na kardiovaskulární morbiditě a mortalitě mají ischemická choroba srdeční (ICHS) a její klinické formy a cévní mozková příhoda (CMP) (2).

ICHS je onemocnění, při kterém není srdce dostatečně prokrvováno. Klinicky se nejčastěji projevuje jako infarkt myokardu a angina pectoris, což jsou algické formy ICHS. Dále se ICHS může projevovat jako arytmie nebo srdeční selhání (3).

CMP je akutní stav, při kterém je mozek nedostatečně prokrven a následně jsou poškozeny jeho funkce. Vzniká důsledkem poruchy mozkového krevního oběhu, nejčastěji na podkladě trombózy nebo embolie (3).

Podkladem ICHS a CMP je aterosklerotický plát, který postupně zužuje nebo až uzavírá tepny zásobící myokard a mozkovou tkáň kyslíkem (4).

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění postihující tepny. V narušené stěně tepny se hromadí krevní lipidy a zánětlivé buňky a zmnožuje se fibrózní tkáň. Stěna tepny se v místě poškození postupně ztlušťuje a vzniká aterosklerotický plát. Ten zmenšuje lumen tepny a v případě vzniku trombu může tepnu zcela uzavřít (4, 5).

Ateroskleróza vzniká působením řady rizikových faktorů, z nichž některé můžeme ovlivnit, např. úpravou životního stylu. Onemocnění se klinicky projevuje jako ICHS, ischemická choroba dolních končetin (ICHDK), CMP či arteriální hypertenze a to podle oblasti, která byla zasažena ischemií (3, 4).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

2.1.1 Obecná struktura cév

Krevní cévy rozdělujeme na artérie, kapiláry a vény. Cévní stěna se skládá ze 3 vrstev. Vnitřní vrstvu představuje tunica intima, prostřední tunica media a zevní tunica adventitia (6).

Tunica intima se skládá z polygonálních endotelových buněk, lemujících lumen cévy, a subendotelové vrstvy vaziva.

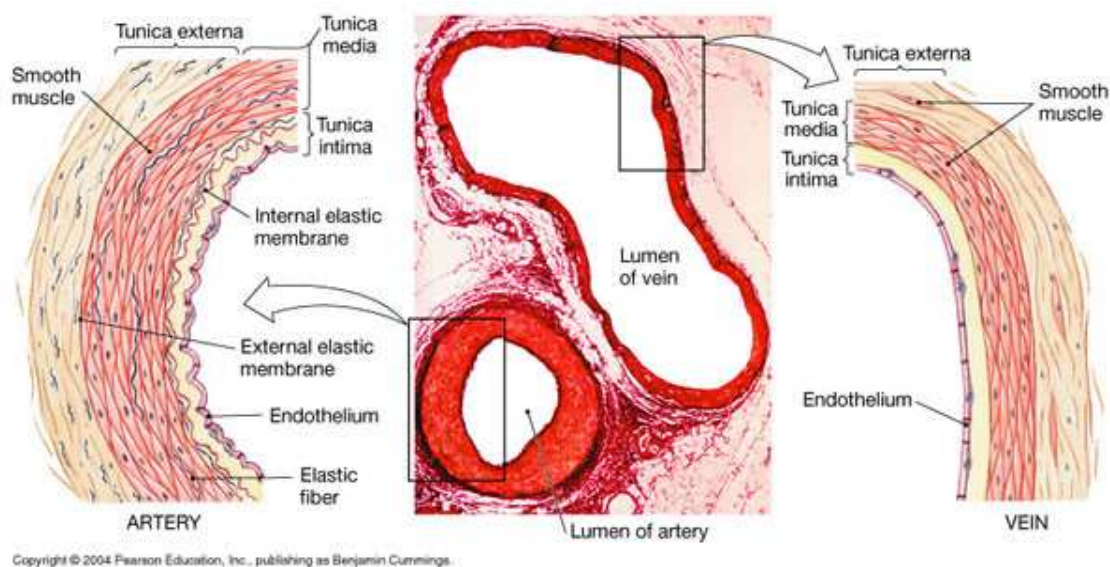
Tunica media obsahuje hladké svalové buňky, kolagenní a elastická vlákna. Někdy se elastická vlákna soustřeďují a vytváří membrana elastica interna a membrana elastica externa, které oddělují tunica media od tunica intima i od tunica adventitia (6).

Tunica adventitia tvoří povrch cévy. Skládá se z kolagenních a elastických vláken. Ta přechází do vaziva v okolí cévy a fixují tak cévu k okolí. Ve větších cévách (průměr > 1 mm) se nachází vasa vasorum. Jde o drobné cévy, které dodávají kyslík a výživu vrstvám stěn cév, které nejsou v bezprostředním kontaktu s krví v lumen cév a nejsou vyživovány difuzí přímo z krve (3, 6).

2.1.2 Srovnání artérií a vén

Tabulka: Srovnání artérie a vény (6,7)

	artérie	véna
stěna	silnější	tenčí
lumen	menší	větší
nejsilnější vrstva stěny	tunica media	tunica adventitia
tvar	cirkulární	nepravidelný
vasa vasorum	méně	vyšší počet
chlopně	nejsou přítomné	přítomné
membrana elastica interna a externa	typické u muskulárních tepen	chybí



Obrázek: Srovnání artérie a vény (8).

http://www.as.miami.edu/chemistry/2086/chapter_21/NEW-Chap21_class_part1_files/image001.jpg
(5.2.2011)

2.1.3 Artérie

Podle průměru a převažující složky v tunica media je dělíme na :

2.1.3.1 Velké elastického typu

Příkladem je aorta a arteria subclavia.

Tunica intima je silnější než u artérií svalového typu. Skládá se z jedné vrstvy plochých endotelových buněk a silné subendotelové vrstvy vaziva. V tunica media převažují koncentricky uspořádaná elastická vlákna, mezi kterými jsou hladké svalové buňky. Tunica adventitia obsahuje elastická a kolagenní vlákna (6,7).

2.1.3.2 Střední svalového typu

Příkladem je arteria renalis.

Tunica intima se skládá z jedné vrstvy endotelových buněk a tlustší subendotelové vrstvy. Od tunica media ji odděluje membrana elastica interna. Tunica media je nejsilnější vrstvou složenou z hladkých svalových buněk. Od tunica adventitia ji odděluje membrana elastica externa. V tunica adventitia najdeme longitudinálně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna a vasa vasorum (6, 7).

2.1.3.3 Arterioly svalového typu

Arterioly jsou nejmenší artérie. Tunica intima obsahuje jednu vrstvu endotelových buněk a velmi tenkou subendotelovou vrstvu. Membrana elastica interna se nachází jen ve větších arteriolách. Tunica media obsahuje 1-5 vrstev hladkých svalových buněk. Tunica adventitia je velmi tenká, složená z elastických a kolagenních vláken (6, 9).

Při ateroskleróze jsou postiženy hlavně elastické a muskulární tepny, při hypertenzi malé tepny a arterioly (7).

2.1.4 Kapiláry

Jsou nejmenší krevní cévy složené z jedné vrstvy plochých endotelových buněk a bazální laminy (9). Struktura endotelových buněk a bazální laminy ovlivňuje prostupnost látek z krve do tkání.

Kapiláry rozdělujeme podle struktury endotelových buněk a charakteru bazální laminy na kapiláry se souvislou výstelkou, fenestrované kapiláry a sinusoidní kapiláry (6, 10).

2.1.4.1 Kapiláry se souvislou výstelkou

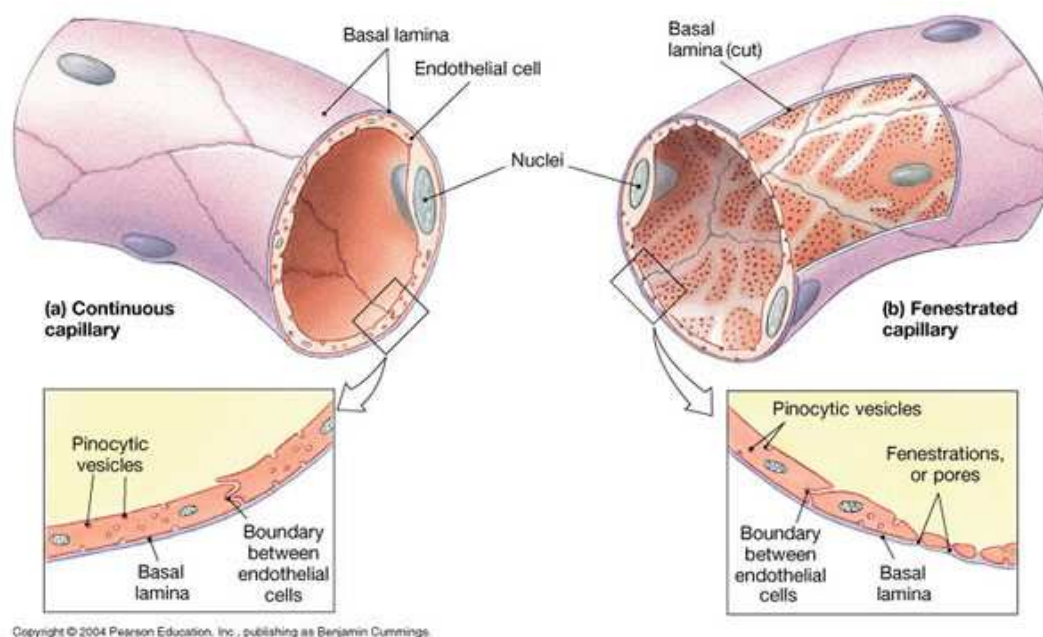
Tyto kapiláry se vyskytují nejčastěji. Jsou tvořeny endotelovými buňkami bez pórů a fenestrací a kontinuální bazální laminou. Nachází se například v centrální nervové soustavě, kde jsou součástí hematoencefalické bariéry (6).

2.1.4.2 Fenestrované kapiláry

Fenestrované kapiláry obsahují endotelové buňky s fenestracemi nebo póry.

A. Kapiláry s fenestracemi obsahují diafragmu, která fenestrace přepažuje. Endotelové buňky obklopuje bazální lamina. Tento typ najdeme v orgánech s rychlou výměnou látek mezi krví a tkáněmi, například v endokrinních žlázách či ve střevě.

B. Kapiláry s póry tvoří endotelové buňky s otvory bez diafragmy. Bazální lamina je kontinuální. Tyto kapiláry tvoří spolu s výběžky podocyků filtrační bariéru v glomerulech ledvin (6).



Obrázek: Srovnání kapiláry se souvislou výstelkou a fenestrované kapiláry (11).

http://www.as.miami.edu/chemistry/2086/chapter_21/NEW-Chap21_class_part1_files/image004.jpg

(5.2.2011)

2.1.4.3 Sinusoidní kapiláry

Sinusoidní kapiláry s nepravidelným lumen mají fenestrované endotelové buňky a diskontinuální bazální laminu. Jsou umístěny v játrech, slezině a kostní dřeni (6).

2.1.5 Vény

Vény mají oproti tepnám tenčí stěnu, větší průměr a širší průsvit. V porovnání s artériemi mají tenčí tunica intima a tunica media. Nejsilnější vrstvou stěny vény je tunica adventitia (6, 7). V žilách končetin jsou vyvinuté chlopně. Jde o párové výchlipky tunica intima, tvořené elastickou vazivovou tkání, pokryté endotelem. Chlopně usměrňují proudění krve směrem k srdci (3, 6).

Podle průměru vény dělíme na:

2.1.5.1 Velké vény

U velkých vén se struktura mění v závislosti na jejich lokalizaci. Např. vena cava superior. Tunica intima se skládá z endotelu a subendotelové vrstvy. Tunica media je

tenká, složená z několika vrstev hladkých svalových buněk. Nejsilnější vrstvu představuje tunica adventitia. Ta obsahuje kolagenní vlákna a hladké svalové buňky, které zpevňují stěnu vén (6).

2.1.5.2 Střední a malé vény

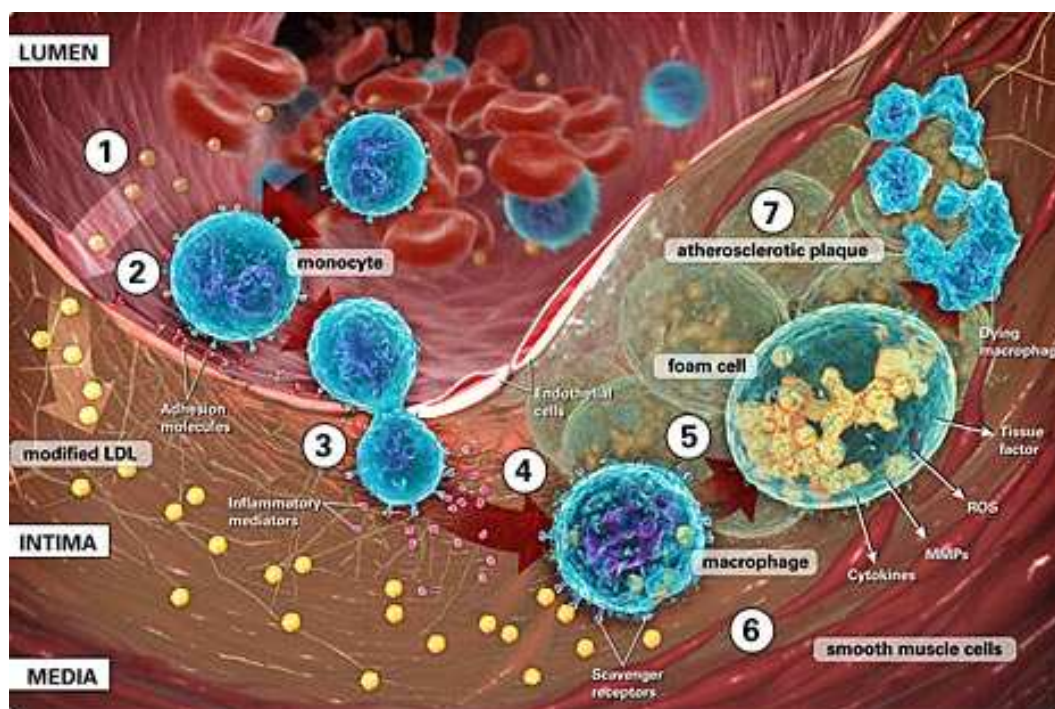
Tunica intima je tvořena endotelem a tenkou subendotelovou vrstvou vaziva. Vychlipuje se a vytváří chlopně usměrňující tok krve. Tunica media obsahuje svazečky hladkých svalových buněk, elastická a kolagenní vlákna. Tunica adventitia obsahuje kolagenní vlákna a hladké svalové buňky (6).

2.1.5.3 Venuly

Tunica intima je tvořena endotelem a velmi malou vrstvou subendotelového vaziva, bez chlopní. Membrana elastica interna chybí. Tunica media je tenká, složená z několika vrstev hladkých svalových buněk. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou, složenou ze silné vrstvy vaziva s kolagenními vlákny (6, 9).

2.2 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění, které postihuje velké tepny elastického typu a střední tepny svalového typu. Hlavní příčinou vzniku aterosklerózy je poškození endotelu, ten ztrácí své vlastnosti a umožňuje pronikání LDL-částic do subendotelového prostoru. Na povrchu aktivovaných endotelových buněk adherují monocyty a T-lymfocyty a následně pronikají skrz endotel do stěny artérie, kde se monocyty mění v makrofágy. Buňky hladké svaloviny proliferují a migrují z média do intimy a stěna cévy se ztlusťuje. LDL-částice podléhají ve stěně tepny oxidaci a jsou pohlcovány makrofágy za vzniku pěnových buněk. Kumulace pěnových buněk, hladkých svalových buněk a dalšího materiálu vede ke vzniku ateromového plátu (7, 12, 13).



Obrázek: Schéma aterogeneze (14).

http://www.laddmcnamara.com/assets/images/vascular_inflammation.jpg (9.8.2011)

Ve velkých tepnách (aorta) působí ateroskleróza zúžení média, stěna ztrácí tonus a podléhá působení krevního tlaku (KT). Vzniká aneuryzma neboli aterosklerotická výduť (7). Ve středních a menších tepnách (koronární a mozkové) ateroskleróza zužuje průsvit, může dojít k trombóze a krvácení do aterosklerotického plátu. To má za následek nedostatečné prokrvení orgánů, které cévy zásobují kyslíkem (12).

2.2.1 Epidemiologie

Ateroskleróza je příčinou většiny KVO. Klinicky se projevuje nejčastěji jako ICHS, ICHDK a CMP. KVO je hlavní příčinou úmrtí jak v Evropě, tak v ČR. V roce 2004 byla v ČR celková úmrtnost na KVO 46,3 % u mužů a 57,1 % u žen (2).

2.2.2 Rizikové faktory

Na vzniku a rozvoji aterosklerózy se podílí rizikové faktory. Ty poškozují cévní endotel a hrají tak důležitou roli v iniciaci a progresi aterosklerózy (15). Při současném

výskytu více rizikových faktorů výrazně roste nebezpečí vzniku aterosklerózy- vliv rizikových faktorů se násobí (7, 16).

Rizikové faktory dělíme na neovlivnitelné a ovlivnitelné.

2.2.2.1 Neovlivnitelné faktory:

- Věk- riziko manifestace stoupá s věkem, u mužů je rizikový věk po 45. a u žen po 55.roce života (4).
- Pohlaví- větší riziko je u mužů, ženy jsou až do menopauzy chráněny estrogeny (4,16).
- Rodinná anamnéza- předčasný výskyt aterosklerózy u rodičů nebo sourozenců, většinou důsledkem geneticky podmíněné hypercholesterolemie a dyslipoproteinémie (4, 7).

2.2.2.2 Ovlivnitelné faktory

- Kouření tabáku- indukuje dysfunkci endotelu, zvyšuje LDL-cholesterol a zvyšuje tvorbu oxidovaného LDL-cholesterolu (16).
- Dyslipidémie- vysoká koncentrace LDL-cholesterolu, triacylglycerolů a nízká koncentrace HDL-cholesterolu (4).
- Vysoký KT- narušuje integritu endotelu (13).
- Diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance (7).
- Obezita centrálního typu (4).
- Nedostatek fyzické aktivity (4).
- Zvýšená koncentrace homocysteinu (13).

2.2.3 Patogeneze aterosklerózy

Dříve se předpokládalo, že aterosklerotické pláty vznikají mechanickým ukládáním lipidů do arteriální stěny. Později přišel Virchow s inflamační teorií, která považuje hyperplazii intimy za produkt lokálního zánětu. Dnes se vznik aterosklerózy vysvětluje spojením hypotézy zánětlivé odpovědi poškozeného endotelu s lipidovou hypotézou (13, 17).

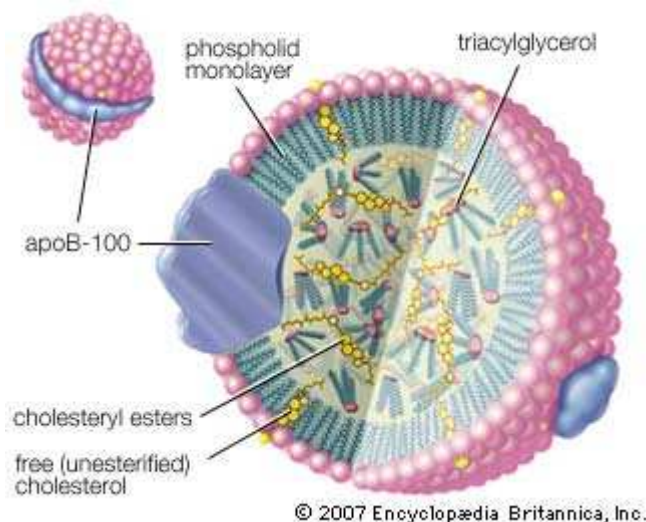
2.2.3.1 Role lipoproteinů

Mezi lipidy řadíme cholesterol, fosfolipidy, triacylglyceroly a jejich složky. Jde o látky nerozpustné ve vodě. Cholesterol a fosfolipidy jsou součástí biologických membrán. Triacylglyceroly představují hlavní energetickou rezervu a jejich mastné kyseliny jsou bezprostředním zdrojem energie pro buňku. Cholesterol a triacylglyceroly jsou nerozpustné v hydrofilní krevní plazmě, proto se v krvi vážou na apolipoproteiny, které zajišťují jejich transport. Krví putují ve formě lipoproteinů, tedy komplexů lipidů a apolipoproteinů (18).

Lipoproteiny třídíme podle hustoty (18, 4):

- Chylomikrony
- Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL)
- Lipoproteiny se střední hustotou (IDL)
- Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL)
- Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL)

Platí, že čím vyšší je hustota, tím je nižší obsah tuků v lipoproteinu.



Obrázek: Složení LDL lipoproteinů (19).

http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2008_Groups/group06/Images/LDL.jpg (9.8.2011)

Lipoproteinové částice mají nepolární jádro s triacylglyceroly a esterifikovaným cholesterolem, a polární plášť z fosfolipidů, volného cholesterolu a apolipoproteinů (18).

Do procesu aterogeneze významně zasahují především LDL-částice s dlouhým biologickým poločasem, jejichž funkcí je transportovat cholesterol do periferních tkání.

LDL-částice reagují s LDL-receptory (na všech buňkách) a se scavengerovými receptory (na monocytech, makrofázích, hladkých svalových buňkách a endoteliích). Počet LDL-receptorů je zpětnovazebně regulován. Při nadbytku cholesterolu v buňce se snižuje počet LDL-receptorů. Ke scavengerovým receptorům mají vyšší afinitu chemicky modifikované LDL-částice. Monocyty a makrofágy pohlcují tyto částice bez omezení, jelikož scavengerové receptory nejsou zpětnovazebně regulovány (13, 17). LDL-částice mohou být chemicky modifikovány oxidací (volnými radikály) jak v krvi, tak i v intimě tepny. Takto modifikované lipoproteiny podporují adhezi monocytů na endotel a jejich pronikání do intimy tepny. Navíc oxidací LDL-částic stoupá jejich afinita ke scavengerovým receptorům na monocytech a makrofázích. Oxidované LDL-částice jsou pak neomezeně vychytávány monocyty a makrofágy. Přeplněné makrofágy se mění v pěnové buňky (13, 17, 18). Akumulace LDL-částic se přednostně objevuje v místech náchylných k rozvoji aterosklerotických lézí (větvení artérií nebo zakřivení, kde je narušen tok krve) (20).

2.2.3.2 Role endotelu

Endotel vystýlající cévy se skládá z jedné vrstvy plochých, těsně k sobě přiléhajících endotelových buněk (6). Funguje tedy jako bariéra, která zabraňuje pronikání velkých molekul. Mimo to je i metabolicky aktivní a ovlivňuje řadu funkcí.

Normální endotel reguluje cévní tonus produkcí látek, které způsobují vazodilataci (oxid dusnatý, prostacyklin, bradykinin) nebo vazokonstrikci (endotelin, tromboxan A₂) (21).

Dále brání nefyziologické aktivaci krevní koagulace s následnou trombózou (22).

Ovlivňuje permeabilitu cévní stěny. Na prostupu krevních elementů se podílejí adhezní molekuly (vascular cell adhesion molecule-1- VCAM-1, intercellular cell adhesion molecule-1- ICAM-1, P-selektin, E-selektin) exprimované aktivovaným endotelem (22).

Narušení funkce endotelu označujeme jako endotelovou dysfunkci (3). Tu iniciují hlavně oxidované LDL-částice, vysoký KT, diabetes mellitus a kouření (23). Poškozený cévní endotel je více propustný, má omezenou schopnost vazodilatace,

podporuje agregaci trombocytů a adhezi leukocytů (zvýšenou expresí endotelových adhezních molekul) (21). Endotelová dysfunkce je považována za první stadium rozvoje aterosklerózy (5).

2.2.3.3 Role hladkých svalových buněk

Rozlišujeme 2 fenotypy hladkých svalových buněk: kontraktilní a syntetický. Buňky kontraktilního fenotypu reagují na vazoaktivní látky (endotelin, prostaglandiny, leukotrieny, oxid dusnatý). Buňky syntetického fenotypu produkují složky extracelulární matrix (kolagen, elastin, proteoglykany), což přispívá k růstu plátu.

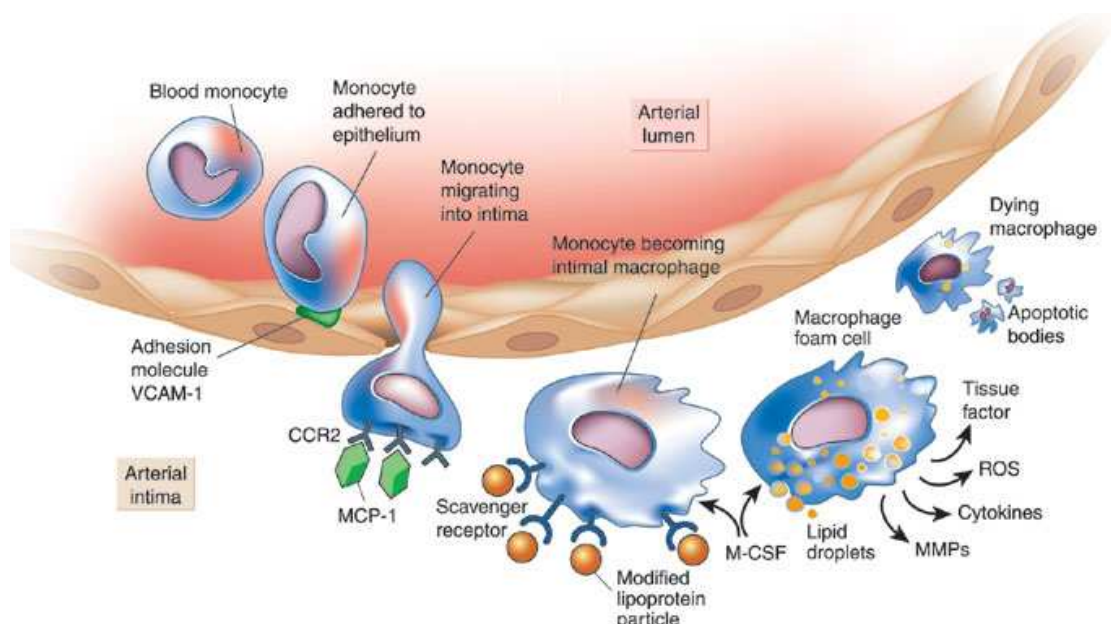
Buňky hladkého svalstva migrují z medie do subendotelového prostoru na popud různých růstových faktorů (např. PDGF, IGF-1) produkovaných makrofágy, trombocyty a endotelovými buňkami. Tam proliferují a transformují se v buňky syntetického fenotypu, které produkují extracelulární matrix (kolagen, proteoglykany - ty strukturu plátu zpevňují) (7, 13).

2.2.3.4 Role leukocytů

Mezi leukocyty řadíme monocyty, makrofágy a lymfocyty.

Pokud je endotel aktivován (selektiny, adhezními molekulami, cytokiny), zajišťuje vstup monocytem (a dalších buněk jako např. T-lymfocytů; LDL-částic) do subendotelového prostoru. Nejprve se monocyty zachytí a roluje po endotelové buňce (zprostředkováno selektiny), dále adhezuje (zprostředkováno endotelovými adhezními molekulami VCAM-1, ICAM-1) a nakonec vstupuje do intimy (5). Zde se mění v makrofág.

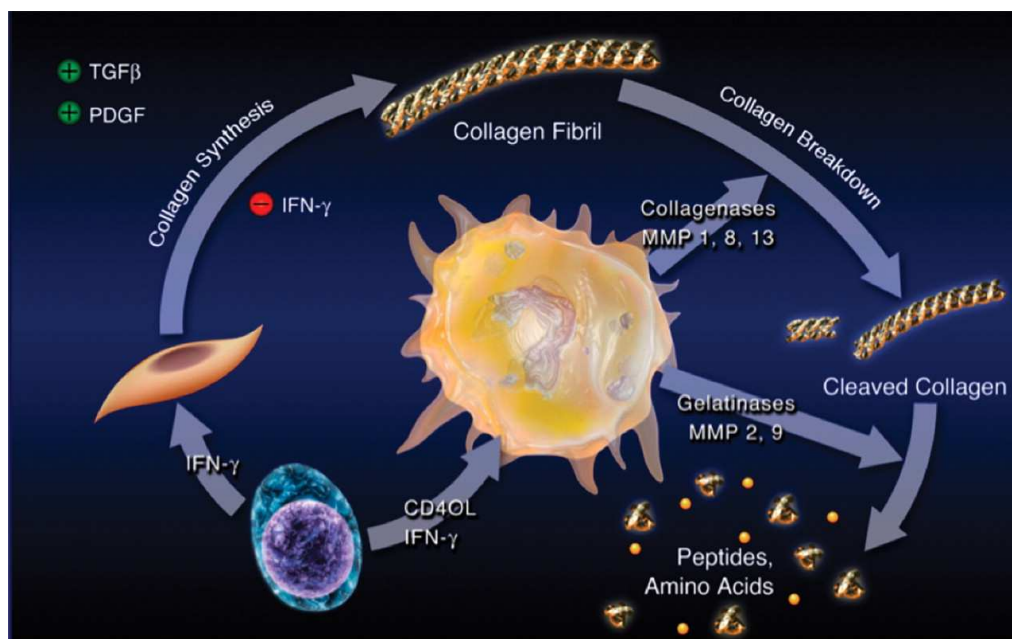
Monocyty a makrofágy mají na svém povrchu LDL-receptory a scavengerové receptory. Počet LDL-receptorů je zpětnově regulován hladinou cholesterolu, zatímco scavengerové receptory nepodléhají žádné regulaci. Platí tedy, že čím více je LDL-částic v arteriální stěně, tím více jsou fagocytovány makrofágy. Pokud se cholesterol akumuluje v buňce příliš rychle, buňka se zvětšuje a mění se v rezidenční makrofág, který už arteriální stěnou neprochází a změní se v pěnovou buňku. Rezidenční makrofágy a pěnové buňky jsou nestabilní, rozpadají se a jejich intracelulární obsah vytváří extracelulární masu ateromu (13).



Obrázek: Role monocytů a makrofágů v procesu aterogeneze (24).

<http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/images/nature01323-f1.2.jpg> (9.8.2011)

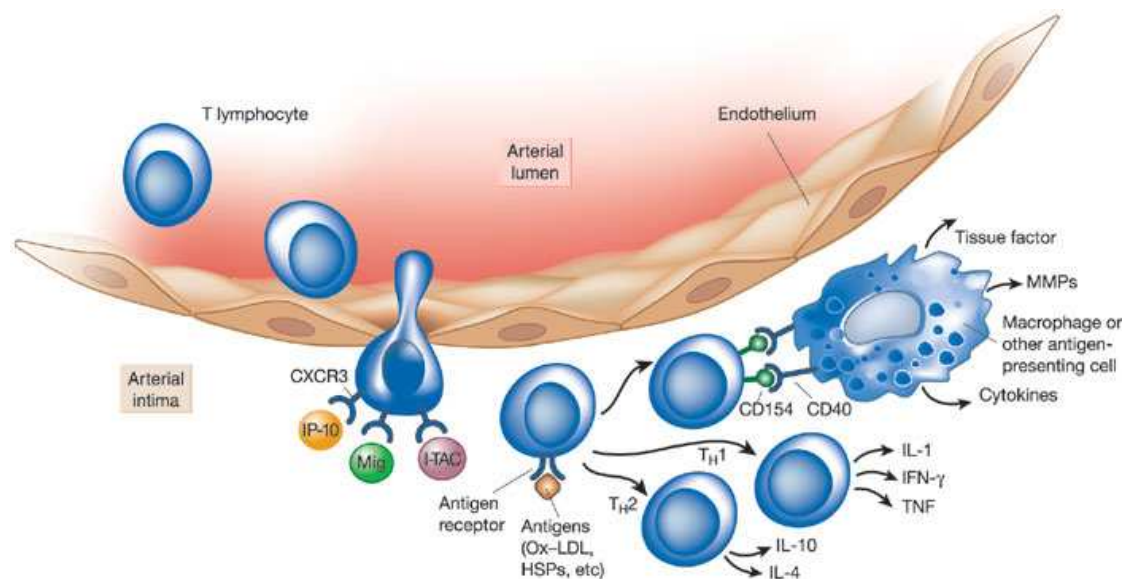
Aktivované makrofágy produkují cytokiny (např. interleukiny, TNF), které atrahují další monocyty a T-lymfocyty do subendotelového prostoru. Dále produkují matrixové metaloproteinázy (MMP)- enzymy (kolagenáza, gelatináza) štěpící mezibuněčnou hmotu (5).



Obrázek: Cytokiny aktivovaný makrofág produkuje metaloproteinázy štěpící kolagen (25).

<http://www.jlr.org/content/50/Supplement/S352/F2.large.jpg> (9.8.2011)

T-lymfocyty podporují zánětlivou reakci. Vstupují do intimy prostřednictvím VCAM-1 a produkují prozánětlivé cytokiny. Ty aktivují makrofágy.



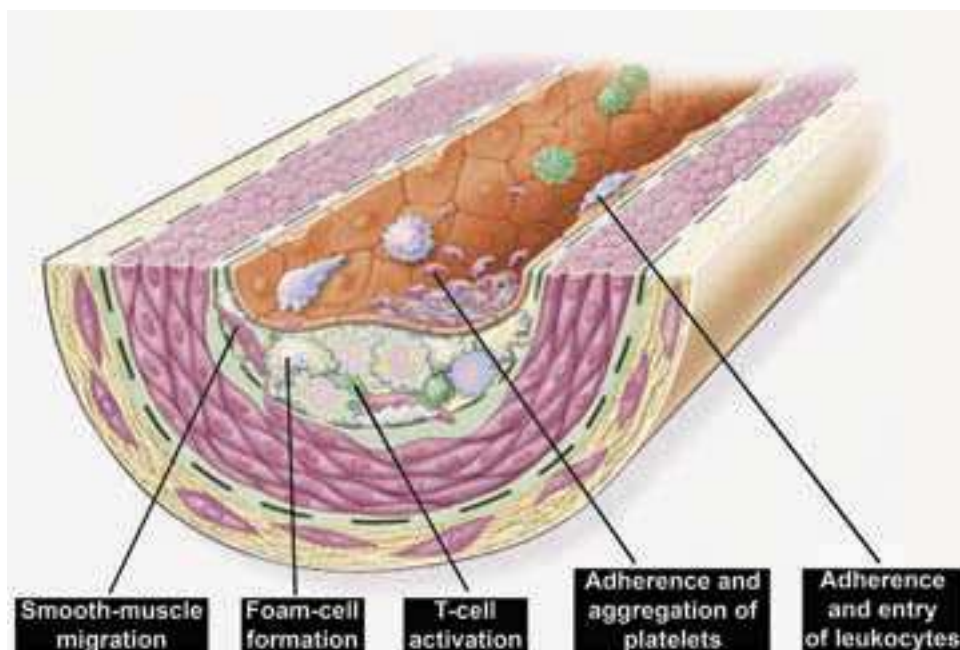
Obrázek: Role T-lymfocytů v procesu aterogeneze (26).

<http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/images/nature01323-f2.2.jpg> (9.8.2011)

2.2.3.5 Typy aterosklerotických lézí

Lipidní skvrny, proužky

Základem jsou nahromaděné pěnové buňky. Ty se mění v rezidenční makrofágy neschopné vycestovat ze stěny tepny. Časem se rozpadají, uvolňují svůj obsah a vytváří extracelulární masu aterosklerotické léze. Dále jsou přítomné T-lymfocyty. Jde o reverzibilní stav, proužky mohou být resorbovány nebo naopak progredují (17).



Obrázek: Tukové proužky (27).

<http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/files/gicd/athero.jpg> (9.8.2011)

Fibrózní pláty (stabilní)

Jedná se o různě prominující ložiska v intimě tužší konzistence. Obsahují pěnové buňky, hladké svalové buňky, kolagenní vazivo a menší množství lipidů. Povrch plátu je hladký a tuhý. Tvoří ho silné vazivové pouzdro (7, 13, 17).

Ateromové pláty (nestabilní)

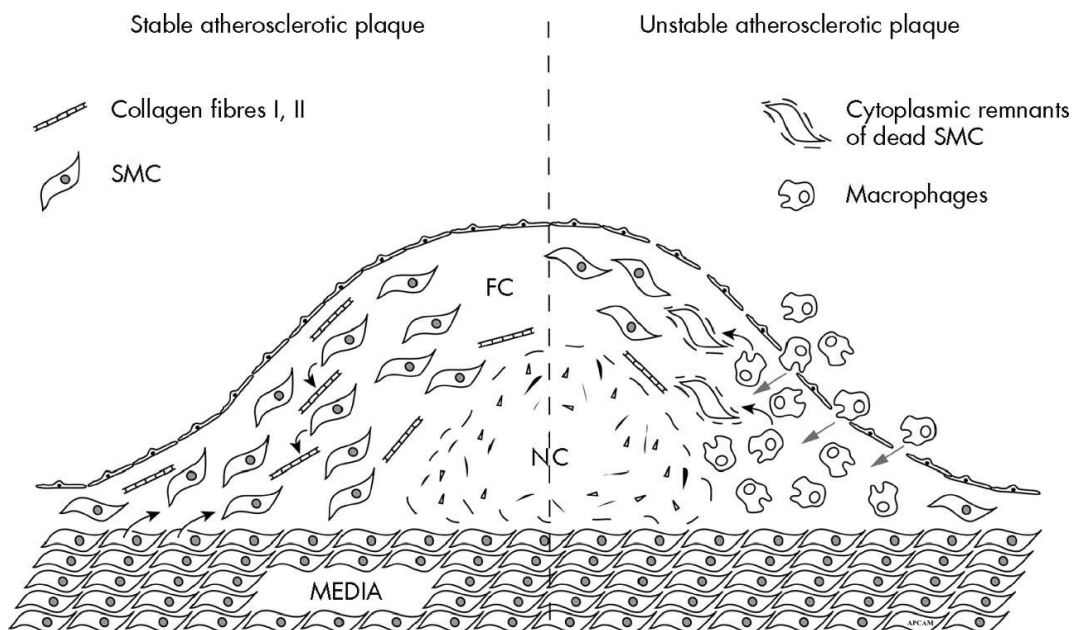
Jde o ložiska v intimě měkčí konzistence, která prominují do lumen arterie. Obsahují pěnové buňky, hladké svalové buňky, vazivové buňky a vysoký podíl lipidů. Plát má v centru ložisko kašovitých ateromových hmot a na vrcholu slabý fibrózní kryt. Pod ním se hromadí aktivované makrofágy a T-lymfocyty.

T-lymfocyty prostřednictvím cytokinů snižují tvorbu kolagenu a spouští apoptózu hladkých svalových buněk.

Aktivované makrofágy produkují metaloproteinázy degradující matrix. Pouzdro je ztrátou svalových buněk i matrix oslabováno (17).

Dysrupci vyvolá například zvýšený KT, tachykardie (poškozením endotelu) nebo zvětšující se nestabilní tukové jádro (rupturou fibrózního krytu). Následně dochází k adhezi destiček a ke vzniku trombu (13, 17).

Tento proces ovlivňuje střední a velké arterie a je charakterizován vnitřními ztluštěními subintimy, které zasahují do lumen artérie.



Obrázek: Srovnání stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (28).

<http://heart.bmj.com/content/92/11/1557/F1.large.jpg> (9.8.2011)

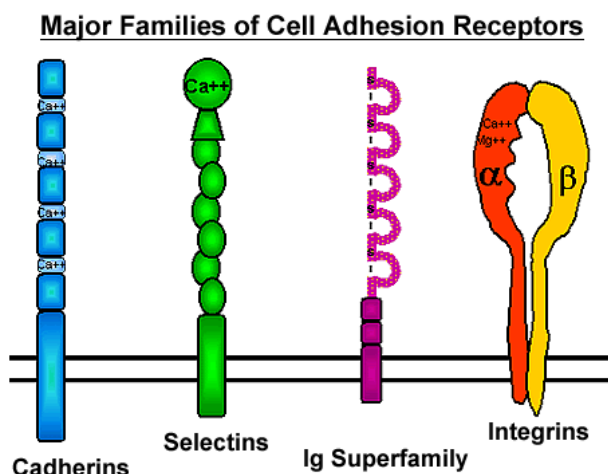
2.3 BUNĚČNÉ ADHEZNÍ MOLEKULY

Buněčné adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru exprimované na povrchu buněk všech tkání organismu (29).

2.3.1 Typy adhezních molekul

Rozlišujeme 4 hlavní třídy buněčných adhezních molekul:

- 1) Selektiny
- 2) Integriny
- 3) Imunoglobulinové adhezní molekuly
- 4) Kadheriny



Obrázek: Hlavní třídy buněčných adhezních molekul (30).

<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/CellAdhesion/camfamilies.gif>

(9.8.2011)

Adhezní molekuly se uplatňují v řadě patologických procesů. Jejich exprese je zvýšená při KVO. U nádorových buněk přispívá ztráta adhezivity k tvorbě metastáz. Dále se pak buněčné adhezní molekuly ICAM-1, VCAM-1 a P-selektin používají k určování stáří poranění v soudním lékařství (31).

Ateroskleróza je spojena s dysfunkcí endotelu. Při poškození a zánětlivých procesech cév dochází účinkem uvolněných cytokinů ke zvýšené expresi adhezních molekul ze skupiny integrinů, selektinů a imunoglobulinové skupiny a následně ke zvýšené adhezi a migraci zánětlivých buněk přes cévní stěnu (29).

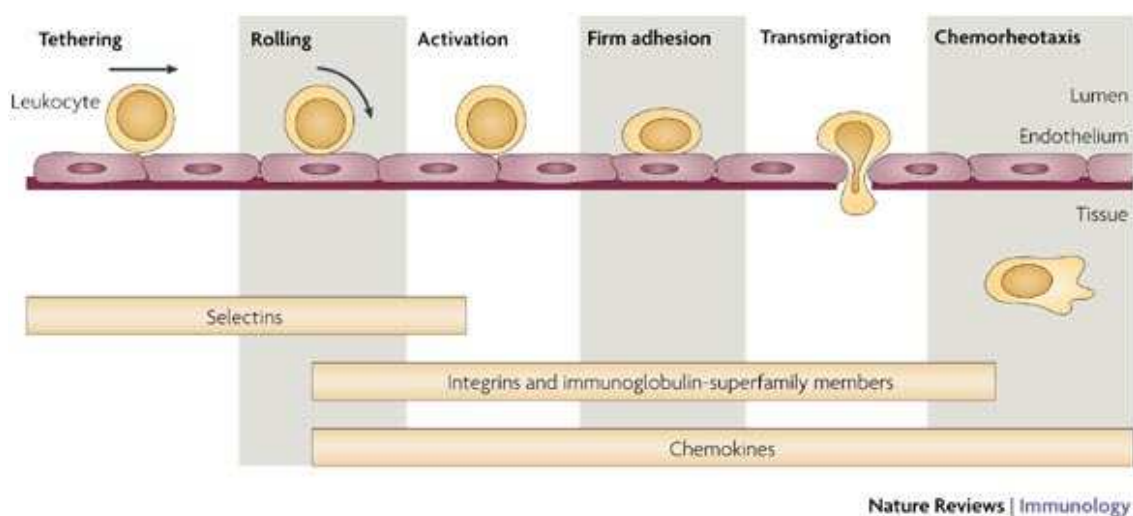
Narušení funkce endotelu je první známkou aterosklerózy a může být detekováno angiografií nebo ultrazvukem ještě před strukturálními změnami cévní stěny (21). Poškozený cévní endotel mění své vlastnosti a umožňuje tak prostup LDL-částic a zánětlivých buněk do subendotelového prostoru. Právě pro přestup leukocytů do stěny artérie jsou klíčové buněčné adhezní molekuly, které zprostředkovávají rolování leukocytů na povrchu aktivovaných endotelových buněk, adhezi a následnou transmigraci leukocytů přes endotel (22).

Za fyziologických podmínek buněčné adhezní molekuly regulují cévní permeabilitu. V průběhu zánětlivé odpovědi dochází k upregulaci povrchové exprese adhezních molekul.

4 hlavní kroky prostupu leukocytů endotelem

Prostup leukocytů do oblasti zánětu je regulovaný proces. Důležitou roli přitom hrají adhezní molekuly a chemokiny.

- Iniciální na selektinu závislé přivázání a rolování.
- Spouštění adheze cestou chemokinů a jejich receptorů nebo vazbou selektinu na PSGL-1.
- Na integrinu závislá adheze a zesílení adheze shlukováním integrinu.
- Transport skrz endotel (22).



Obrázek: Schéma prostupu leukocytů endotelem (32).

<http://www.nature.com/nri/journal/v7/n6/images/nri2096-i1.jpg> (9.8.2011)

Iniciální rolování leukocytů zprostředkovávají hlavně selektiny a P-selektin glykoprotein ligand (PSGL-1) na povrchu leukocytů, zatímco zpomalení leukocytů a zpevnění adheze je zprostředkováno VCAM-1 a ICAM-1 na endotelu, které váží β_1 a β_2 integriny exprimované na leukocytech (33).

2.3.1.1 Selektiny

Zprostředkovávají iniciální zachycení, přivázání a rolování leukocytů podél endotelu (22). Zpomalují leukocyty před migrací přes endotel. Pro navázání interakce s endotelovými buňkami se leukocyty nejprve musí přesunout z hlavního proudu tekoucí krve k cévní stěně.

Selektiny a jejich ligandy zprostředkovávají nízkoafinitní slabou interakci, což se projevuje jako rolování leukocytů. Slabě navázané leukocyty jsou potom vystaveny nízké koncentraci zánětlivých mediátorů, což vede k aktivaci leukocytů a následné adhezenci závislé na integrinech (34).

Rozlišujeme P-selektin, E-selektin a L-selektin.

P-selektin je exprimován trombocyty, endotelovými buňkami, cévními hladkými svalovými buňkami a makrofágy v arteriální cévní stěně jako odpověď na poranění. Exprese P-selektinu na makrofázích může modulovat produkci prozánětlivých mediátorů makrofágy, produkci reaktivních forem kyslíku makrofágy, diferenciaci makrofágů v pěnové buňky a růst, apoptózu a zánětlivou aktivaci cévních hladkých svalových buněk a endotelových buněk. P-selektin se účastní počátečních kroků přestupu leukocytů přes endotel do stěny artérie a zprostředkovává interakce trombocytů a leukocytů s poškozenou cévní stěnou. Váže PSGL-1, který je konstitučně exprimován monocyty a lymfocyty. P-selektin hraje klíčovou roli ve zprostředkování počátečních kroků prostupu leukocytů (hlavně monocytů) do stěny artérie u zánětu a cévního onemocnění (35). Oxidovaný LDL stimuluje indukci P-selektinu endotelovými buňkami (36).

E-selektin je exprimován endotelovými buňkami (při zánětu) až po aktivaci cytokiny (IL-1, TNF- α). Exprese E-selektinu je tedy inducibilní. Váže PSGL-1 (exprimovaný leukocyty), CD44 (exprimovaný lymfocyty a endotelem) a E-selektin ligand-1 (22).

P- a E-selektiny jsou exprimovány v akutně i chronicky zánětlivém endotelu a slouží jako rolovací molekuly pro leukocyty (monocyty, T-lymfocyty, B-lymfocyty) (22).

L-selektin je konstitučně exprimován leukocyty. Vazbou s ligandy na endotelových buňkách zpomaluje pohyb leukocytů po endotelu.

2.3.1.2 Integriny

Integriny se vyskytují na povrchu téměř všech druhů buněk. Zprostředkovávají přichycení mezi buňkami navzájem a mezi buňkou a okolní tkání. Jsou důležité pro pronikání leukocytů do cévní stěny.

Integriny jsou schopni rychle měnit konformaci jejich extracelulární domény a shromáždit se jako odpověď na aktivaci (22).

Hlavní integriny, které se účastní regulace prostupu leukocytů jsou α_4 a β_2 integriny.

$\alpha_4 \beta_1$ integrin (VLA-4) je běžně exprimován leukocyty a slouží jako ligand pro VCAM-1. Pro jejich vazbu je však nutná aktivace leukocytů, ta vyvolá konformační změny integrinů, jejichž výsledkem je zvýšená afinita k adhezním molekulám (22).

Všechny leukocyty konstitučně exprimují leukocytární funkční antigen-1 (LFA-1), což je člen β_2 podrodiny integrinů. LFA-1 se váže ke dvěma endotelovým molekulám ICAM-1 a ICAM-2. Ty patří do Ig superrodiny.

2.3.1.3 Imunoglobulinové adhezní molekuly

ICAM-1 a VCAM-1 jsou buněčné adhezní molekuly, které se podílejí na aterogenezi tím, že podporují akumulaci leukocytů v intimě arterie (37).

Během rozvoje počátečních aterosklerotických lézí hrají ICAM-1 a VCAM-1 klíčovou roli v prostupu leukocytů do cévní stěny. Později VCAM-1 z cévního lumen mizí, zatímco ICAM-1 je exprimován endotelem i v pozdějších fázích (38).

ICAM-1 je kontinuálně exprimován na membráně leukocytů a endotelových buněk v nízké koncentraci (39). VCAM-1 není za běžných podmínek exprimován (na povrchu neaktivovaných endotelových buněk) (40). Jejich exprese rychle stoupá za patofyziologických podmínek (41). ICAM-1 a VCAM-1 jsou exprimovány arteriálními endotelovými buňkami v místech náchylných k rozvoji aterosklerotických lézí (cévní zakřivení, bifurkace) u myši s normální hladinou cholesterolu a exprese obou adhezivních molekul je upregulována vysoce cholesterolovou stravou (21, 29, 34).

Exprimované na povrchu endotelových buněk zprostředkovávají vazbou k ligandu adhezi leukocytů k aktivovanému endotelu. ICAM-1 se váže k LFA-1 a VCAM-1 se váže k VLA-4, což jsou integriny exprimované leukocyty (42, 43).

Dále jsou VCAM-1 a ICAM-1 exprimovány fenotypicky modulovanými hladkými svalovými buňkami a makrofágy (39).

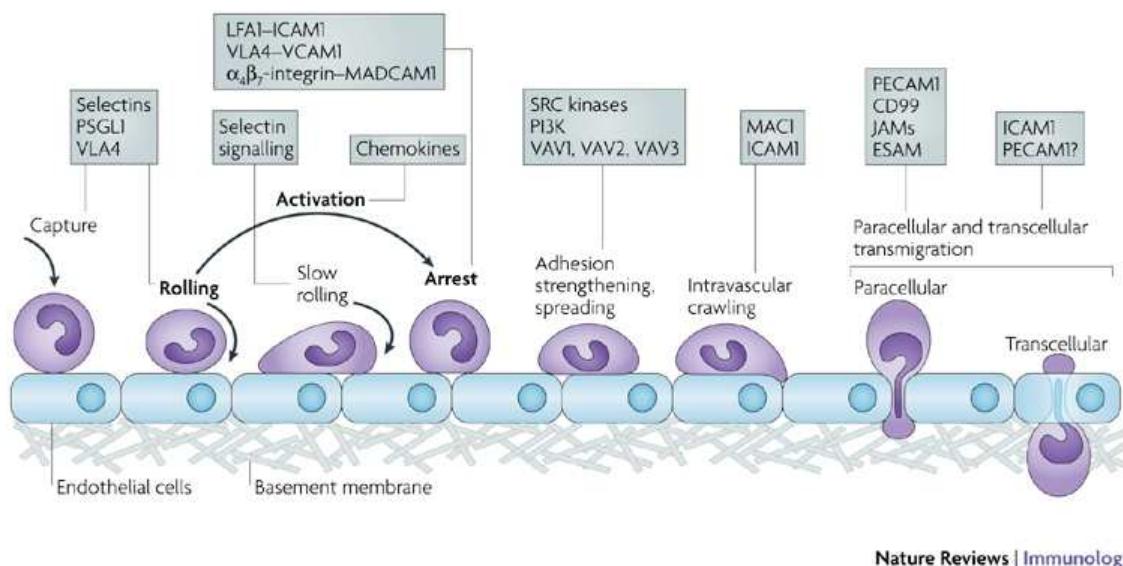
Exprese VCAM-1 a ICAM-1 je indukována prozánětlivými cytokiny (26). Cytokiny IL-1, IL-4, TNF- α a IFN- γ produkované leukocyty indukují expresi ICAM-1 a VCAM-1 a dalších adhezních molekul (33, 43, 44). Dále expresi ICAM-1 a VCAM-1 zvyšují

aterogenní strava, oxidované LDL-částice, hemodynamická zátěž, bakteriální endotoxiny, kouření a diabetes mellitus (22, 45, 46, 47).

Role jednotlivých adhezních molekul v prostupu leukocytů endotelem

Nejprve, aktivované endotelové buňky v místech vznikající aterosklerózy exprimují P-selektin, který zprostředkovává rolování cirkulujících monocytů.

Prostup cirkulujících monocytů endotelem se děje prostřednictvím pevně regulovaného vícekrokového procesu zprostředkovaného kombinací buněčných povrchových adhezních molekul. P-selektin se na endotelových buňkách váže na PSGL-1 leukocytů a další glykosylované ligandy na monocytech. Za normálního krevního toku selektiny zprostředkovaná interakce není dostatečná k zajištění rolování leukocytů. Selektiny umožňují rolování leukocytů na endotelu a přes PSGL-1 aktivují integriny a indukují aktivaci monocytů. Integriny umožňují jak rolování, tak adhezi leukocytů. Nejvýznamnější integrin exprimovaný monocyty u aterosklerózy je $\alpha_4\beta_1$ integrin (VLA-4). $\alpha_4\beta_1$ integrin zprostředkovává rolování vazbou na ligand VCAM-1 v případě nižší afinity a zpevňuje adhezi ve stavu vyšší afinity (tyto stavy se liší konformací). VCAM-1 není za fyziologických podmínek běžně exprimován, je exprimován na endotelu aktivovaným cytokiny. Monocyty stejně jako lymfocyty exprimují VLA-4 a LFA-1. VLA-4 je hlavní ligand zprostředkovávající rolování a zpevnění adheze leukocytů k zánětlivému endotelu (36).



Obrázek: Schéma prostupu leukocytů endotelem (48).

[http:// www.nature.com/nri/journal/v7/n9/images/nri2156-f1.jpg](http://www.nature.com/nri/journal/v7/n9/images/nri2156-f1.jpg) (9.8.2011)

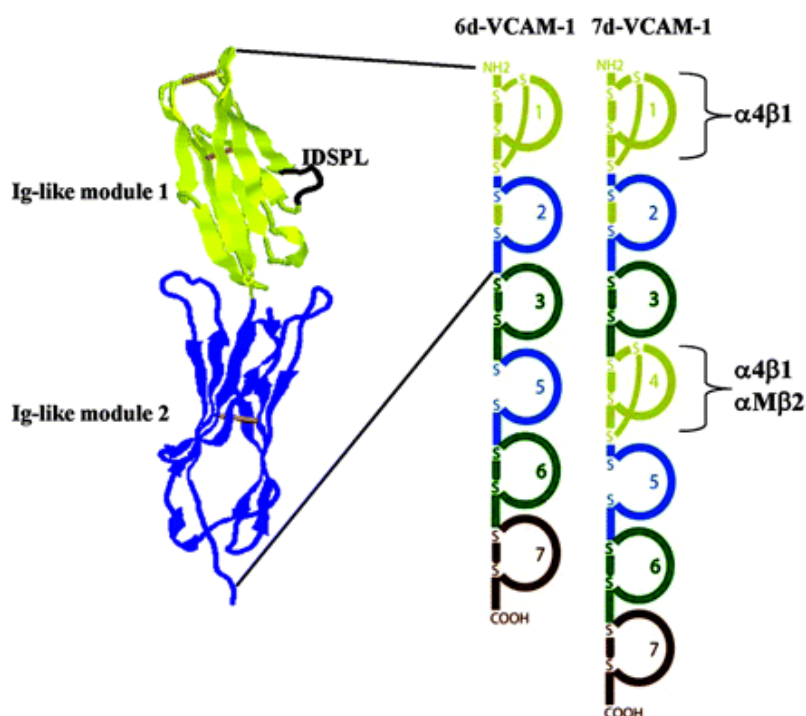
2.3.2 Struktura VCAM-1

Jedná se o transmembránový glykoprotein kódovaný VCAM-1 genem. VCAM-1 patří do imunoglobulinové superrodiny proteinů. Pro tu je typická přítomnost alespoň jedné 90-100 aminokyselinové imunoglobulinové (Ig) domény složené ze dvou antiparalelních β -skládaných listů, které jsou stabilizovány disulfidickou vazbou (40).

VCAM-1 je nejprve syntetizován jako prekurzorový protein, který je následně zpracován proteolýzou a glykosylací hrubým endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (32). Po syntéze je VCAM-1 rychle dopraven k plazmatické membráně a distribuován na lumenální buněčném povrchu (40).

Rozlišujeme 2 formy VCAM-1: buď se 6 nebo 7 extracelulárními Ig doménami složenými z aminokyselin (AK) (49).

Hlavní forma lidského VCAM-1 se skládá z krátkého cytosolového konce (z 19 AK), transmembránové části (z 22 AK) a dlouhé glykosylované extracelulární oblasti. Ta obsahuje 7 Ig domén. Jejich číslování začíná u domény nejvzdálenější od plazmatické membrány. Extracelulární oblast tvoří celkem 674 AK (40).



Obrázek: Extracelulární oblast VCAM-1 se 7 Ig doménami (50).

<http://www.jleukbio.org/content/83/1/1/F2.expansion.html> (9.7.11)

Ig domény v extracelulární oblasti zprostředkovávají interakci s receptory leukocytů a dalšími ligandy. VCAM-1 obsahuje 2 místa pro vazbu $\alpha_4\beta_1$ -integrinu leukocytů: Ig domény 1 a 4. Po navázání ligandu k extracelulární doméně se spouští signální kaskády prostřednictvím cytosolové části VCAM-1 (51). Cytosolový konec tedy zprostředkovává transdukci signálu (40).

VCAM-1 obsahuje 2 oblasti velmi citlivé k působení proteázy: mezi doménou 3 a 4 a v doméně 5. Je možné, že proteolytická degradace VCAM-1 hraje roli v regulaci VCAM-1 (49).

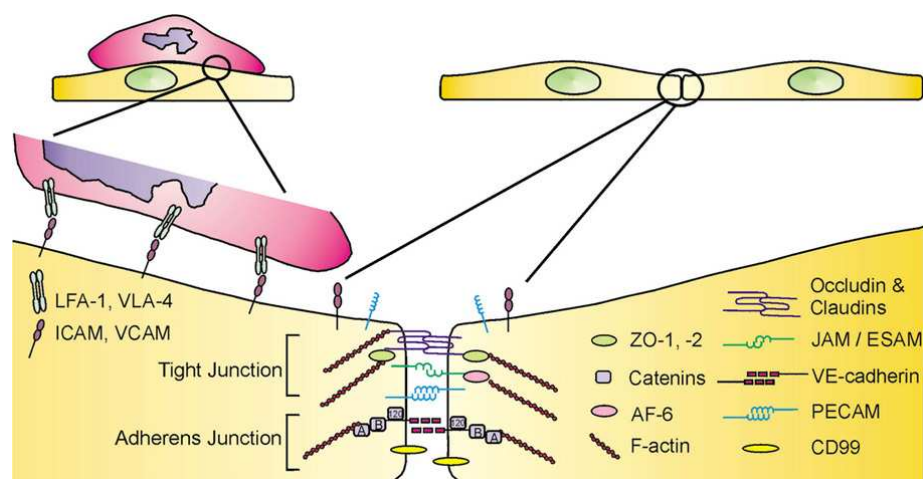
Pepinsky et al. (1992) zjistili, že první tři domény stačí pro adhezi závislou na $\alpha_4\beta_1$ -integrinu a aktivaci T-bb (49).

2.3.3 Exprese VCAM-1 endotelovými buňkami

VCAM-1 hraje klíčovou roli v prostupu leukocytů do cévní stěny, a to především během rozvoje počátečních aterosklerotických lézí (38). Akumulace lymfocytů a monocytů v místech cévního zánětu je tedy závislá na VCAM-1 (34).

VCAM-1 se váže k $\alpha_4\beta_1$ integrinu, který je exprimován leukocyty. V případě nižší afinity vazby k $\alpha_4\beta_1$ integrinu zprostředkovává VCAM-1 rolování leukocytů, v případě vyšší afinity vazby zpevňuje VCAM-1 adhezi leukocytů k aktivovanému endotelu (41).

VCAM-1 není za fyziologických podmínek běžně exprimován (40). Výjimku tvoří arteriální endotelové buňky v oblastech náchylných k rozvoji aterosklerotických lézí (cévní zakřivení, bifurkace) u myši s normální hladinou cholesterolu (52).



Obrázek: Imunoglobulinové adhezivní molekuly exprimované endotelovými buňkami (53).

<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3395/fig2.jpg> (9.8.2011)

2.3.3.1 Regulace exprese VCAM-1 endotelovými buňkami

Expresi VCAM-1 endotelovými buňkami je regulována proaterogenními faktory (22). Stereologická analýza potvrdila, že cholesterolová strava zvyšuje endotelovou expresi buněčných adhezních molekul ICAM-1, VCAM-1 a P-selektinu (39). Zatímco nativní LDL-částice zvyšují expresi pouze ICAM-1, oxidované LDL-částice zvyšují expresi jak ICAM-1, tak i VCAM-1 lidskými cévními endotelovými buňkami (22).

Prozánětlivé cytokiny výrazně upregulují expresi VCAM-1 endotelovými buňkami (54). IL-1 a TNF- α , produkované především makrofágy, a IL-4 a IFN- γ , produkované hlavně lymfocyty, indukují expresi VCAM-1 a dalších adhezních molekul (33).

Zvláštní postavení mezi cytokiny má IL-8, produkovaný endotelovými buňkami při zánětu. IL-8 se účastní aterosklerózy prostřednictvím leukocytové atrakce a indukce

zpevnění adheze monocytů k endotelu v rozvíjejících se lézích. Hastings et al. (2009) prokázali, že hemodynamika mající sklony k ateroskleróze indukuje sekreci IL-8 endotelovými buňkami a ta konkuruje s expresí VCAM-1 endotelovými buňkami a hladkými svalovými buňkami. IL-8 tedy omezuje expresi VCAM-1 hladkými svalovými buňkami jako odpověď na zánětlivé stimuly (45).

Dále expresi VCAM-1 endotelovými buňkami zvyšují hemodynamická zátěž, kouření či diabetes mellitus, kteří přispívají k endotelové dysfunkci (47).

2.3.4 Exprese VCAM-1 hladkými svalovými buňkami

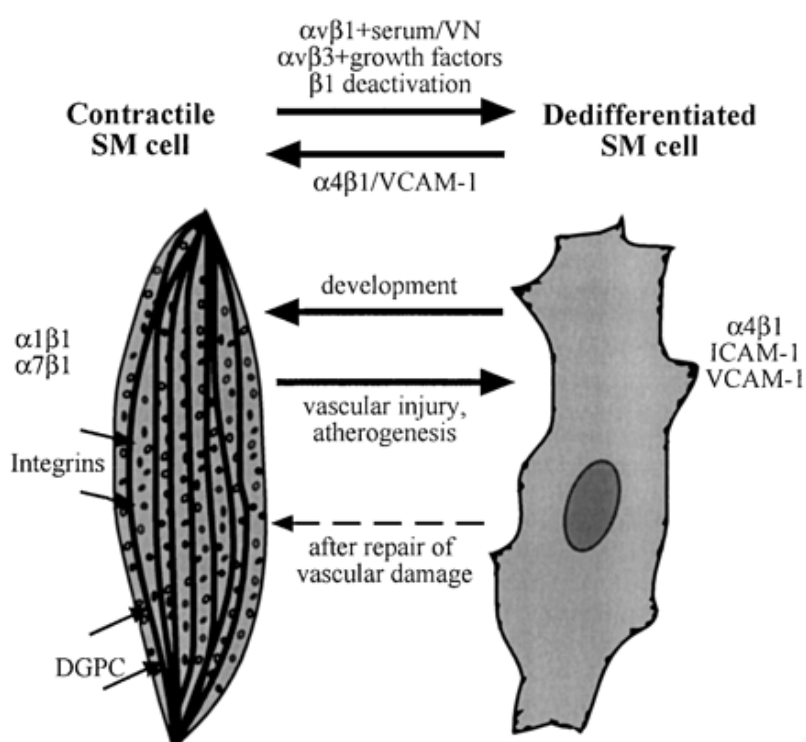
Adhezní molekuly VCAM-1 a ICAM-1 jsou exprimovány na dospělých cévních hladkých svalových buňkách pouze za patologických podmínek (55). Kromě endotelových buněk exprimují buněčné adhezní molekuly VCAM-1 a ICAM-1 i fenotypicky modulované intimální hladké svalové buňky v aterosklerotické cévní stěně (56). VCAM-1 je hojně exprimována intimálními buňkami především v oblasti nad membrana elastica interna a na mediálních hladkých svalových buňkách, které sousedí s intimálními lézemi (39, 57).

Důkaz exprese adhezních molekul na hladkých svalových buňkách v lidské aortě a věnčitých tepnách pochází z imunohistochemických studií, které používají protilátky proti ICAM-1 nebo VCAM-1 (42).

2.3.4.1 Diferenciace hladkých svalových buněk

VCAM-1 a ICAM-1 jsou exprimovány nevyvinutými hladkými svalovými buňkami již během embryogeneze. U embryonálních myší byla pozorována silná exprese VCAM-1 především v mezenchymu, který je předpokládaným zdrojem rozvíjejících se hladkých svalových buněk (58). Exprese VCAM-1 a ICAM-1 potom klesá během ontogeneze a obě adhezní molekuly chybí na diferencovaných kontraktilních hladkých svalových buňkách v medii dospělých tepen (59, 60). U aterosklerózy prodělávají hladké svalové buňky změnu fenotypu z kontraktilního na syntetický, podobající se fetálním hladkým svalovým buňkám (61, 62). Diferenciace hladkých svalových buněk je spojena s upregulací adhezních molekul (55). Exprese adhezních molekul by tedy mohla být interpretována jako marker změny fenotypu hladkých svalových buněk (42).

Cuff et al. (2001) prokázali, že pro diferenciaci fenotypu hladkých svalových buněk v syntetický typ je potřebný CD44. Jedná se o adhezní protein exprimovaný zánětlivými a cévními buňkami, který podporuje adhezi aktivovaných lymfocytů a makrofágů k endotelu a hladkým svalovým buňkám. CD 44 je exprimován na hladkých svalových buňkách v normálních cévách a upregulován na hladkých svalových buňkách nacházejících se pod lézí. CD 44 je nutný pro maximální upregulaci VCAM-1 na hladkých svalových buňkách v myších aterosklerotických lézích (63).



Obrázek: Fenotypy hladkých svalových buněk (kontraktilní a syntetický) a podmínky jejich transformace (64).

<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/52/3/372/F1.medium.gif> (10.7.11)

Několik studií se zabývalo vzájemným vztahem mezi expresí VCAM-1 a ICAM-1 na hladkých svalových buňkách a infiltrací leukocyty. Mediátory produkované leukocyty mohou zasahovat do indukce adhezních molekul v hladkých svalových buňkách. Na druhé straně, exprese adhezních molekul na hladkých svalových buňkách usnadňuje retenci leukocytů v cévní stěně (57, 65). Exprese VCAM-1 na mediálních hladkých svalových buňkách se vyskytuje buď dříve nebo současně s infiltrací leukocyty (66).

Expres VCAM-1 a ICAM-1 hladkými svalovými buňkami v intimě a medii byla nejvýraznější ve fibrózních placích a pokročilých aterosklerotických lézích (42). V aterosklerotických cévách je exprese VCAM-1 v mediálních hladkých svalových buňkách ve spodní vrstvě plaku stejně jako ve fibrózní čepičce (42).

2.3.4.2 Regulace exprese adhezních molekul na hladkých svalových buňkách

Role cytokinů

Korelace mezi mírou exprese adhezních molekul v aterosklerotické cévní stěně a infiltrací mononukleárními buňkami naznačuje potenciální roli mediátorů produkovaných leukocyty v indukci adhezních molekul (42). V aterosklerotických placích jsou T-lymfocyty většinou lokalizovány ve fibrózní čepičce společně s hladkými svalovými buňkami (42). Aktivované T-lymfocyty a makrofágy produkují a uvolňují několik cytokinů s množstvím biologických účinků na sousední buňky (42). Lymfocyty-T uvolňují IL-4 a interferon- γ . IL-4 silně indukuje expresi VCAM-1 v lidských cévních hladkých svalových buňkách (57). Makrofágy uvolňují TNF α a IL-1 β .

Několik in vitro studií zkoumalo účinky cytokinů na expresi ICAM-1 a VCAM-1 na lidských hladkých svalových buňkách izolovaných z různých cévních oblastí. Účinky jednotlivých cytokinů na expresi VCAM-1 a ICAM-1 se mnohdy lišily v závislosti na cévní oblasti, ze které byly hladké svalové buňky izolovány (42). V aterosklerotické cévní stěně byly detekovány cytokiny TNF α a IL-1 β , uvolňované hlavně makrofágy, a interferon- γ uvolňovaný T-lymfocyty (67, 68, 69, 70).

IL-6,8,1 α a TNF- β nemají žádné účinky na expresi VCAM-1 a ICAM-1 (71).

Určité cytokiny fungují jako induktory, zatímco TGF- β , oxid dusnatý a prostacyklin působí jako inhibitory exprese buněčných adhezních molekul na hladkých svalových buňkách. Prostřednictvím těchto mediátorů mohou endotelové buňky regulovat expresi adhezních molekul na hladkých svalových buňkách (72).

Indukce adhezních molekul cytokiny je založena na de novo syntéze (71).

Bylo prokázáno, že cytokiny indukovaná exprese VCAM-1 na hladkých svalových buňkách je závislá na buněčném cyklu. V proliferujících buňkách je exprese VCAM-1 mnohem slabší v porovnání s nedělícími se buňkami (66).

Role LDL lipoproteinů

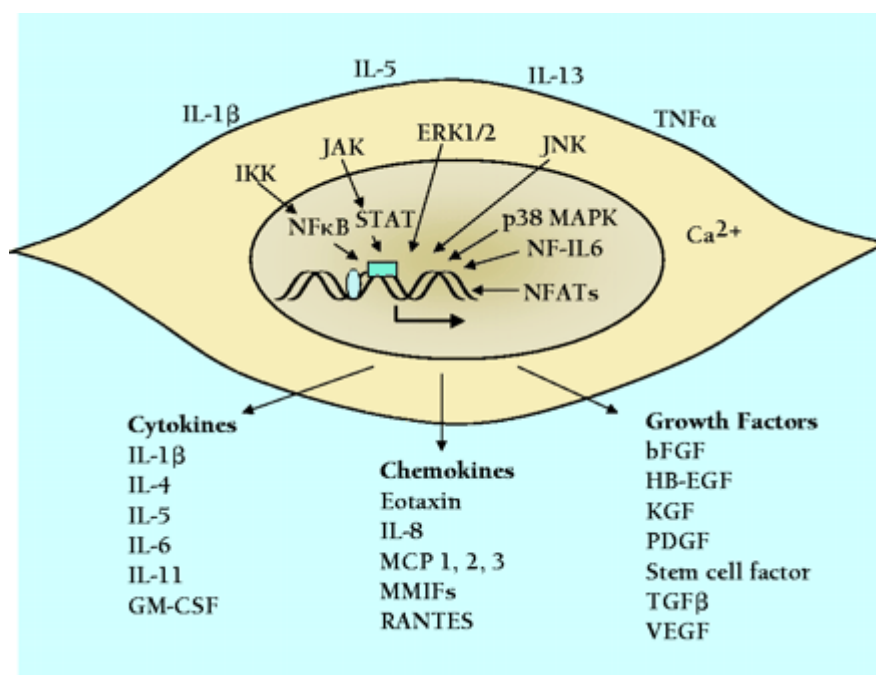
Oxidované LDL-částice sice zvyšují adhezi monocytů k lidským hladkým svalovým buňkám, ale ne cestou upregulace adhezních molekul na hladkých svalových buňkách (73).

Biologické funkce adhezních molekul na hladkých svalových buňkách.

Hladké svalové buňky exprimují na svém povrchu ICAM-1 a VCAM-1. Mimo to produkují řadu interleukinů, chemokinů a růstových faktorů. Tyto látky se podílí na akumulaci monocytů a lymfocytů v místě zánětu uvnitř cévní stěny a tím ovlivňují buněčné složení aterosklerotických plátů (42, 74).

ICAM-1 a VCAM-1 mohou vystupovat jako ko-stimulační signály ve stimulaci T-buněk v průběhu prezentace antigenu (75).

Hladké svalové buňky migrují a prolifерují a jejich produkce extracelulární hmoty je důležitá pro stabilitu aterosklerotických plátů, zatímco akumulace makrofágů a T-buněk a jejich produkce proteáz a určitých cytokinů koreluje s nestabilitou plátu (76). Adhezní molekuly na hladkých svalových buňkách jsou důležité jak pro progresi plaku, tak pro stabilitu plaku, kterou ovlivňují.



Obrázek: Přehled cytokinů, chemokinů a růstových faktorů produkovaných hladkými svalovými buňkami (77).

<http://molinterv.aspetjournals.org/content/2/7/447/F2.expansion.html> (9.8.2011)

2.3.5 Možnosti snížení exprese VCAM-1

2.3.5.1 Monoklonální protilátky

Protilátky, které blokují buď VCAM-1 nebo jeho ligand VLA-4 redukují adhezi monocytů a lymfocytů k aktivovanému endotelu a k cytokiny stimulovaným hladkým svalovým buňkám (42). Blokádou endotelového VCAM-1 se zvyšuje rychlost rolování monocytů (22). Blokující mAb4B9 se váže na extracelulární doménu 1 VCAM-1 (49).

2.3.5.2 Antioxidační látky

Fruebis et al. (1999) ve své studii ukazuje, že antioxidačně působící vitamin E podstatně redukuje upregulaci VCAM-1 mRNA a expresi proteinu VCAM-1 v cévní stěně u králíků krmených vysokocholesterolovou stravou. Podávání vitaminu E snižuje utváření lézí. Závěry z této studie podporují názor, že antioxidanty mohou redukovat aterosklerózu modulací exprese VCAM-1 v cévní stěně (78).

2.3.5.3 Statiny

Statiny jsou kompetitivní inhibitory hydroxymethylglutaryl-koenzymA reductázy. Blokádou tohoto enzymu snižují endogenní syntézu cholesterolu. Následkem toho buňky zvyšují tvorbu LDL-receptorů. To vede k poklesu plazmatické koncentrace LDL-částic (4). Atorvastatin má nejen hypolipidemický, ale i protizánětlivý účinek (snižuje plazmatickou hladinu MCP-1 a silně redukuje expresi VCAM-1 a ICAM-1 v cévní stěně (69).

U apoE/LDL-receptor deficientních myší krmených aterogenní stravou (tyto myší modely rozvíjí vážnou hyperlipidémii a aterosklerózu (79)) byla exprese VCAM-1 zjištěna v endotelu pokrývajícím aterosklerotickou lézi, v cévní intimě aterosklerotické léze a navíc i v tunica media pod aterosklerotickou lézí. Imunohistochemická analýza ukázala, že léčba atorvastatinem redukuje expresi VCAM-1 převážně v aterosklerotických lézích a částečně v cévní medii pod lézemi (hladkými svalovými buňkami), ale ne v endotelu. To může ukazovat na to, že endotelová exprese VCAM-1 tak silně nekoreluje s hladinou cholesterolu u myší (80).

U apoE myšího modelu aterosklerózy Nachtigal et al. (2005) prokázal, že atorvastatin redukuje endotelovou expresi VCAM-1 nezávisle na snížení hladiny

plazmatického cholesterolu. Tato studie potvrzuje protizánětlivý účinek atorvastatinu. Bylo zjištěno, že léčba statiny moduluje sekreci zánětlivých cytokinů makrofágy a T-Ly nebo endotelovými buňkami (80).

2.3.5.4 Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI), sartany

Angiotensin II přispívá vazbou k AT_1 receptoru k aterogenezi aktivací nukleárního faktoru κB (NF- κB). Je to transkripční faktor, který zvyšuje expresi mnoha prozánětlivých genů (např. angiotensinogenného) (34, 81).

Angiotensin II přispívá k aterogenezi indukci oxidačního stresu. Vazbou k AT_1 receptorům indukuje oxidační stres aktivací NAD(P)H oxidázy v buňkách endotelu (82). Dále zesiluje expresi scavengerových ox-LDL receptorů, které jsou exprimovány v počáteční aterogenezi, a zvyšuje expresi MMP-1 (81). Při současném výskytu hypercholesterolemie zvýšeně exprimují buňky endotelu AT_1 receptory (82).

ACEI brání vzniku angiotensinu II cestou inhibice angiotensin konvertujícího enzymu. Sartany blokují AT_1 -receptor a znemožňují tak účinek angiotensinu II.

ACEI a antagonisté AT_1 receptoru blokují angiotensinem II indukovanou aktivaci NF- κB a akumulaci VCAM-1 mRNA. Blokádou aktivace NF- κB tedy snižují plazmatickou hladinu solubilních adhezních molekul, včetně sVCAM-1, což vede ke snížení adheze monocytů k endotelu (52, 81). Znemožněním vazby angiotensinu II k AT_1 -receptoru brání ACEI a sartany tvorbě reaktivních forem kyslíku.

2.4 MYŠÍ MODELY

Pro studium patogeneze aterosklerózy se používaly četné zvířecí druhy - primáti, prasata, králíci a křečci.

Do roku 1992 se používaly především králíci. I přesto, že králíci spontánně nevytváří aterosklerózu, jsou užiteční, protože reagují na vysoce cholesterolovou stravu vznikem lézí (83).

Prasata by byla dobrým modelem pro studium aterosklerózy. Pokud jsou krmena cholesterolem, tak se svou plazmatickou hladinou cholesterolu a rozvojem lézí

podobají lidem. Problémem tohoto zvířecího modelu je jeho cena, obtížná manipulace a údržba (83).

V současné době jsou myši nejužívanějším zvířecím modelem pro studium aterosklerózy. Myši jsou vysoce odolné vůči ateroskleróze díky vysoké hladině HDL a nízké hladině LDL a VLDL (84). Aby se u nich projevila ateroskleróza, musí být geneticky modifikovány.

Výhody myší pro výzkum experimentální aterosklerózy spočívají v tom, že myši rozvíjí aterosklerózu v krátkém čase a snadno se chovají ve větším množství pro experimentální studie. Dále můžeme ovlivňovat jejich životní prostředí a stravu a sledovat tak jejich vliv na aterosklerózu, můžeme provádět genetické experimenty (83).

Mezi nejrozšířenější aterosklerotické modely patří ApoE-deficientní myši a LDL-receptor deficientní myši (84).

2.4.1 ApoE deficientní myši

Apolipoprotein E (apoE) je glykoprotein, který je součástí všech lipoproteinů mimo LDL. Funguje jako ligand pro LDL-receptor. ApoE je zodpovědný za zpětný transport cholesterolu z tkání do jater (18, 84, 83).

U těchto myší byl cíleně inaktivován apoE gen v myších embryonálních kmenových buňkách homologní rekombinací (83). Tyto embryonální kmenové buňky se následně vpraví do embrya s následným vykřížením myšího kmenu (85).

ApoE deficientní myši se od normálních myší liší pouze v profilu lipidů a lipoproteinů. Nedostatek apoE se u myší projevil výrazným zvýšením plazmatické hladiny celkového cholesterolu, zvýšením hladiny triacylglycerolů a snížením hladiny HDL cholesterolu oproti normálním zvířatům. Inaktivace apoE genu tedy vede k závažné hypercholesterolemii a spontánní ateroskleróze i při standardní dietě (84, 86).

ApoE deficientní myši byly prvním myším modelem, který rozvíjel léze podobné těm lidským. U zvířat starých 5-6 týdnů probíhá adheze monocytů k povrchu endotelových buněk v aortě a transendoteliální migrace krevních monocytů do cévní stěny. U zvířat starých 6-10 týdnů se objevují rozvinuté tukové proužky, složené

z pěnových buněk a z migrujících hladkých svalových buněk. Tyto tukové proužky se dále rozvíjí v pokročilé léze složené z nekrotického jádra, obklopeného prolifерujícími hladkými svalovými buňkami, a množství extracelulární matrix. Jediným rozdílem v progresi lézí u myší je fakt, že u myšího modelu nedochází k ruptuře plaku, na rozdíl od lidí, kde k ruptuře plaku dochází a ta může vést k infarktu myokardu (83).

Pokud jsou apoE deficientní myši krmeny „Western type“ dietou (složená z 21% tuku, 0,15% cholesterolu, bez přítomnosti žlučových kyselin), urychluje se formace lézí a roste velikost lézí. U těchto myší se pak adheze monocytů a rozvoj pokročilých lézí objevuje v podstatně dřívějším věku.

Tento model umožňuje studovat patogenezi aterosklerózy a její terapii (84).

2.4.2 LDL-receptor deficientní myši

LDL-receptory na povrchu buněk regulují plazmatickou hladinu cholesterolu vychytáváním LDL a IDL-částic z cirkulace (87).

U lidí způsobuje mutace v genu pro LDL-receptor familiární hypercholesterolemii (84). LDL-receptor deficientní myši indukují vysokou plazmatickou hladinu LDL a IDL-částic.

Tento model reaguje na množství cholesterolu ve stravě. LDL-receptor deficientní myši krmené normální dietou rozvíjí pouze mírné patologické léze s nepatrně zvýšenou plazmatickou hladinou cholesterolu. Pokud jsou krmené dietou bohatou na tuky a cholesterol („western type“), pak masivně rozvíjí ateromové pláty s jádrem vyplněným lipidy. Fibrózní léze nejsou přítomné (83, 87).

2.4.3 ApoE a LDL-receptor double knockout myši

Tento myší model rozvíjí závažnou hyperlipidémii a aterosklerózu. Dokonce i v případě, že jsou myši krmeny standardní dietou je progres aterosklerózy výraznější než u ApoE deficientních myší a LDL-receptor deficientních myší (80, 83).

ApoE a LDL-receptor double knockout myši jsou výhodným modelem pro studium antiaterosklerotického účinku sloučenin bez nutnosti krmení zvířat aterogenní stravou (83).

3 ZADÁNÍ A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi VCAM-1 ve stěně cévy u normocholesterolemických myší kmene C57BL/6J, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta a u hypercholesterolemických apoE-deficientních myší. Pro zobrazení exprese VCAM-1 byly využity imunohistochemické metody.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Jako experimentální model byli použiti samci myši kmene C57BL/6J a apoE-deficientní myši ve věku 6 týdnů. První skupinou byly C57BL/6J myši krmeny standardní laboratorní dietou po dobu 12 týdnů, apoE-deficientní myši byly krmeny cholesterolovou dietou s obsahem 1% cholesterolu po dobu 8 týdnů.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a byla provedena eutanázie předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v - 80°C.

4.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na Klinice gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická analýza v 1 cm dlouhých segmentech aortálního sinu a aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi (Leica, Německo), následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v chladničce při - 80°C. Poté byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C.

Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po 15 minutovém usušení vložily na 10 minut do PBS (phosphate saline buffer). PBS je roztok fosfátových solí, který během barvení sloužil jako pufr o pH 7,4 a vytvářel ideální prostředí pro barvení. Řezy se na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), aby se zablokovala nespecifická vazebná místa. Poté se nechaly inkubovat s avidinem D (15 minut), opláchly se v PBS, nechaly se inkubovat s biotinem (15 minut) a opět se opláchly v PBS. 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. V experimentu byla použita následující primární protilátka: monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) ředěná v BSA 1/100 (BD Pharmingen (California, USA).

Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do 10% goat séra v PBS. Dále se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – goat anti rat, která byla značena biotinem (Vector Laboriem, USA) a opět se řezy vložily do roztoku PBS (5 minut). Pak se řezy vložily na 15 minut do 3 % roztoku peroxidu vodíku PBS. Opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Připravili jsme ABC komplex elite (Vector Laboriem, USA) z roztoku A a roztoku B, do kterého jsme vložili řezy na 30 minut. Řezy se nechaly opláchnout v PBS. K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton–xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton–xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

4.3.1 Pracovní postup

1.	nechat uschnout řezy	60 minut
2.	fixace aceton (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3.	usušit	15 minut
4.	PBS	10 minut
5.	10% zvířecí serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	30 minut
6.	inkubace s avidin D	15 minut

7.	oplach v PBS	5 minut
8.	inkubace s biotinem	15 minut
9.	PBS	oplach
10.	primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
11.	PBS 1	2x5 minut
12.	10% serum v PBS (900 μ l PBS + 100 μ l sera)	15 minut
13.	sekundární protilátka (+ mouse serum v PBS)	30 minut
14.	PBS 3	5 minut
15.	3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
16.	PBS 4	2x5 minut
17.	ABC komplex elite	30 minut
18.	PBS 5	5 minut
19.	DAB (podle návodu)	nutno určit čas
20.	destilovaná voda	oplach
21.	aceton	oplach
22.	aceton-xylen (10:1)	3 minuty
23.	aceton-xylen (1:10)	3 minuty
24.	3x xylen	2 minuty
25.	Eukitt – montování krycího sklíčka	

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla provedena za použití digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Ottawa, Kanada) pomocí softwaru NIS (Labortory Imaging, Česká republika).

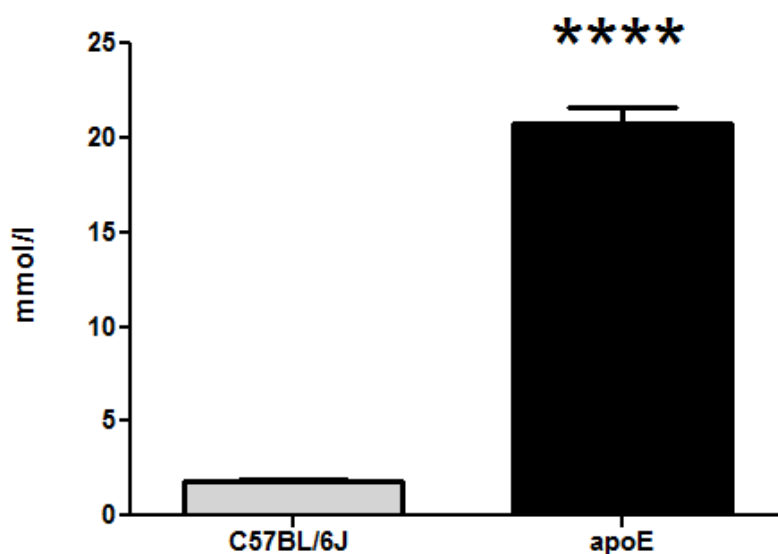
4.4 STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u skupin zvířat byl použit nepárový T test. Rozdíly byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA).

5 VÝSLEDKY

5.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

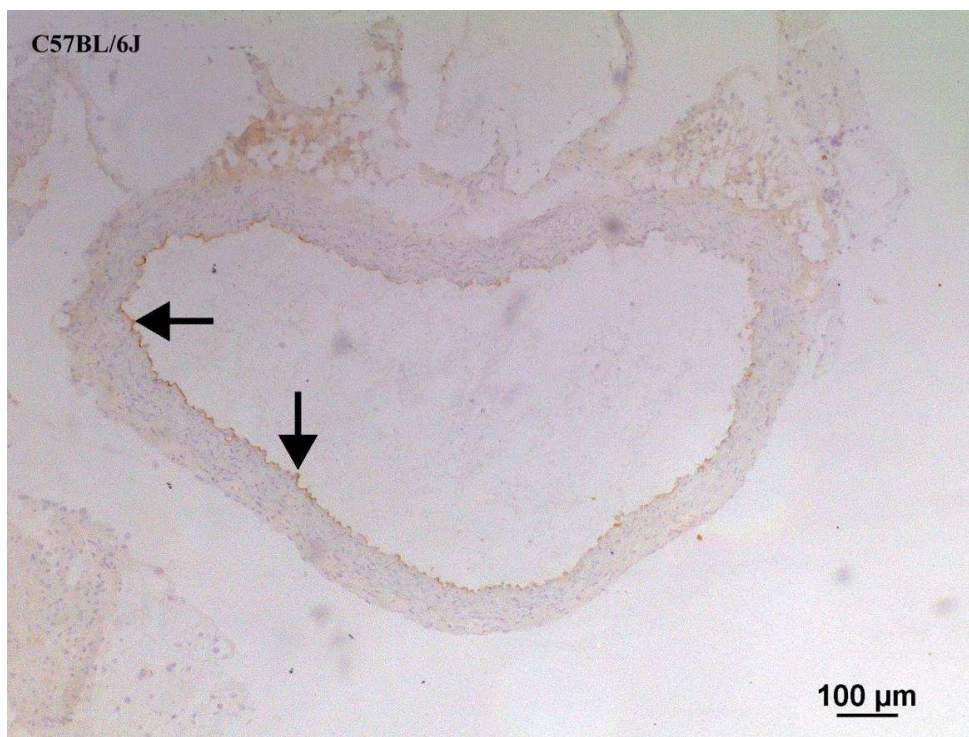
Biochemická analýza jednoznačně prokázala statisticky významný nárůst hladin celkového cholesterolu u apoE-deficientních myší ve srovnání s kmenem C57BL/6J ($1,8 \pm 0,1$ vs. $20,7 \pm 0,8$ mmol/l, $< 0,0001$).



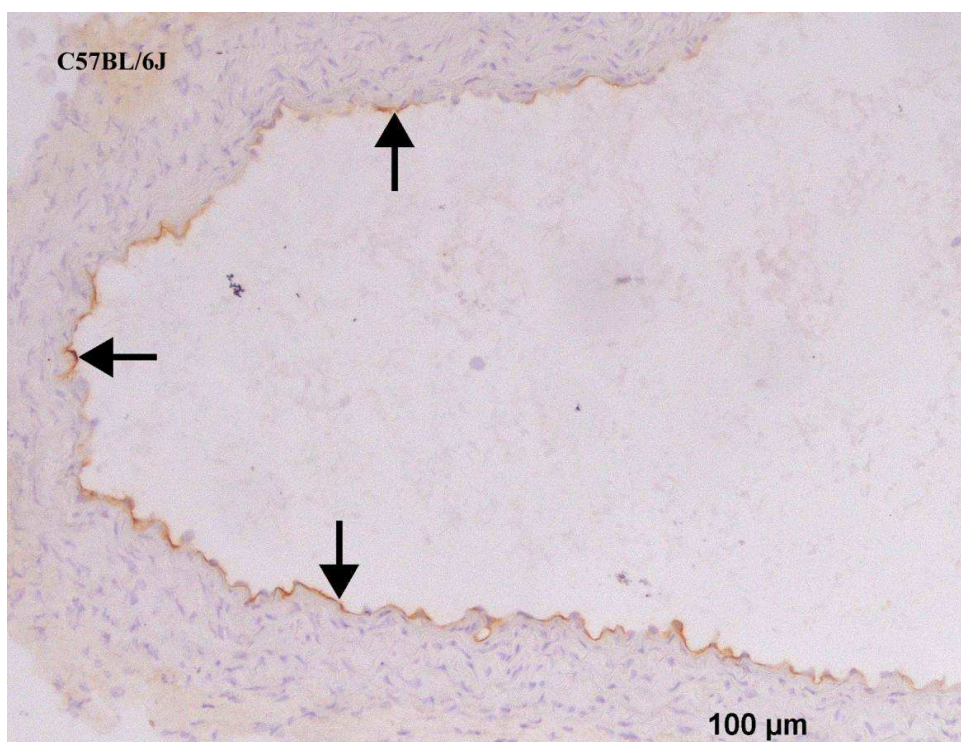
Graf: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin zvířat. ($P < 0,0001$).

5.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V AORTĚ

Pomocí imunohistochemických metod jsme sledovali expresi VCAM-1 v aortě u normocholesterolemických C57BL/6J myší, kde nebyly přítomny žádné aterosklerotické pláty, dále u apoE-deficientních myší v místech bez plátů a u těch samých myší v oblasti plátů. V oblastech, kde nebyly přítomny žádné léze, byla exprese VCAM-1 detekována pouze na cévním endotelu aorty a to zhruba ve stejné intenzitě u C57BL/6J i apoE-deficientních myší. Po zhlédnutí cca 24 řezů pro každou skupinu zde nebyl pozorován rozdíl v expresi VCAM-1. U apoE deficientních myší, kde byly již přítomny aterosklerotické pláty, došlo ke změnám v expresi VCAM-1 ve stěně cévy. Kromě exprese na cévním endotelu plátu i mimo něj byla exprese pozorována také v medii cév a také v aterosklerotických plátech.

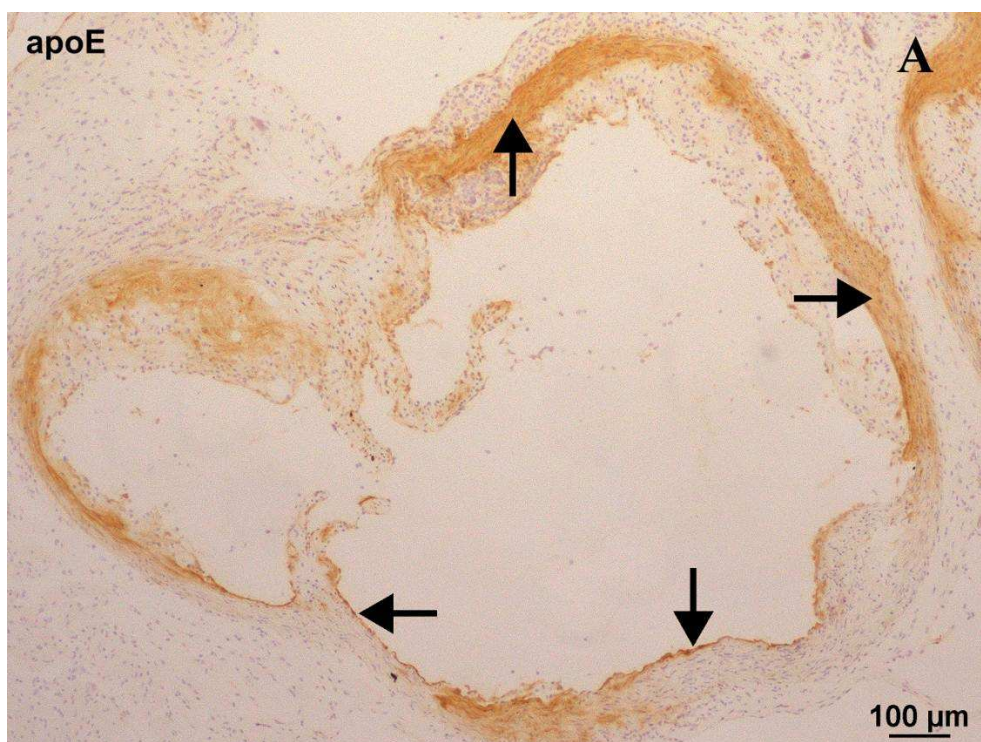
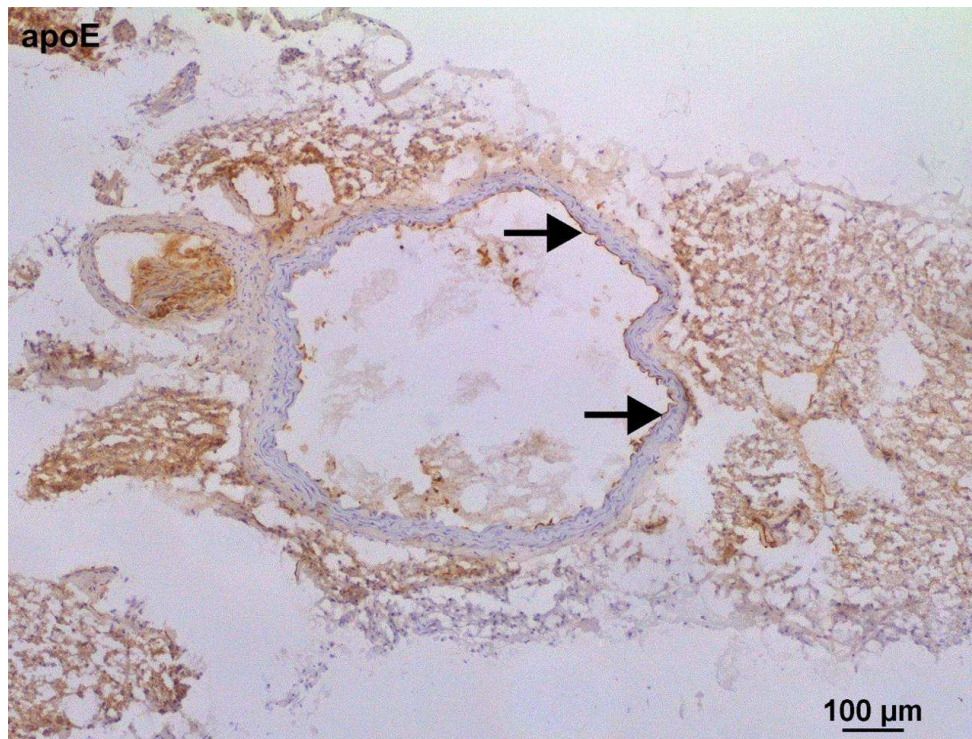


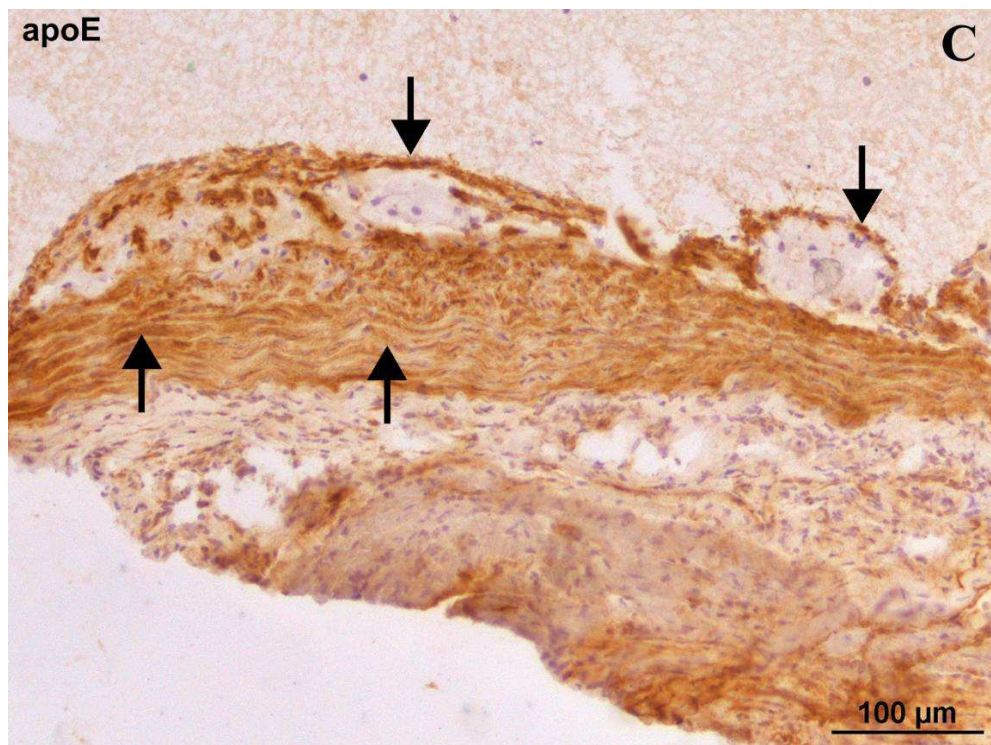
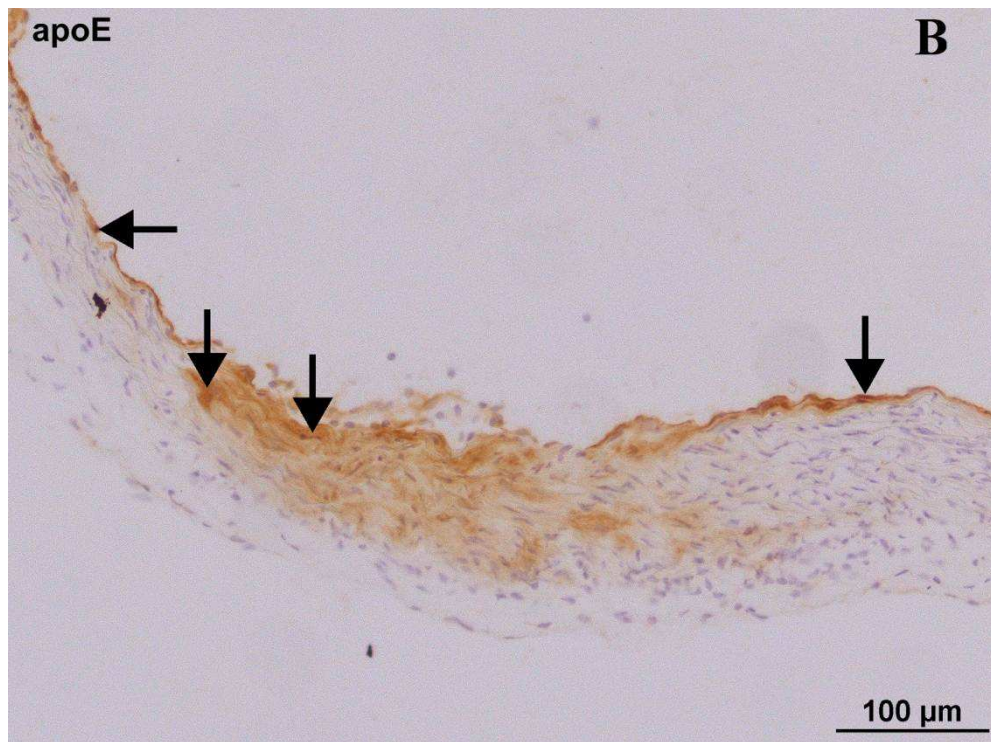
Obrázek: Expres VCAM-1 u C57BL/6J myši. Expres VCAM-1 je detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.

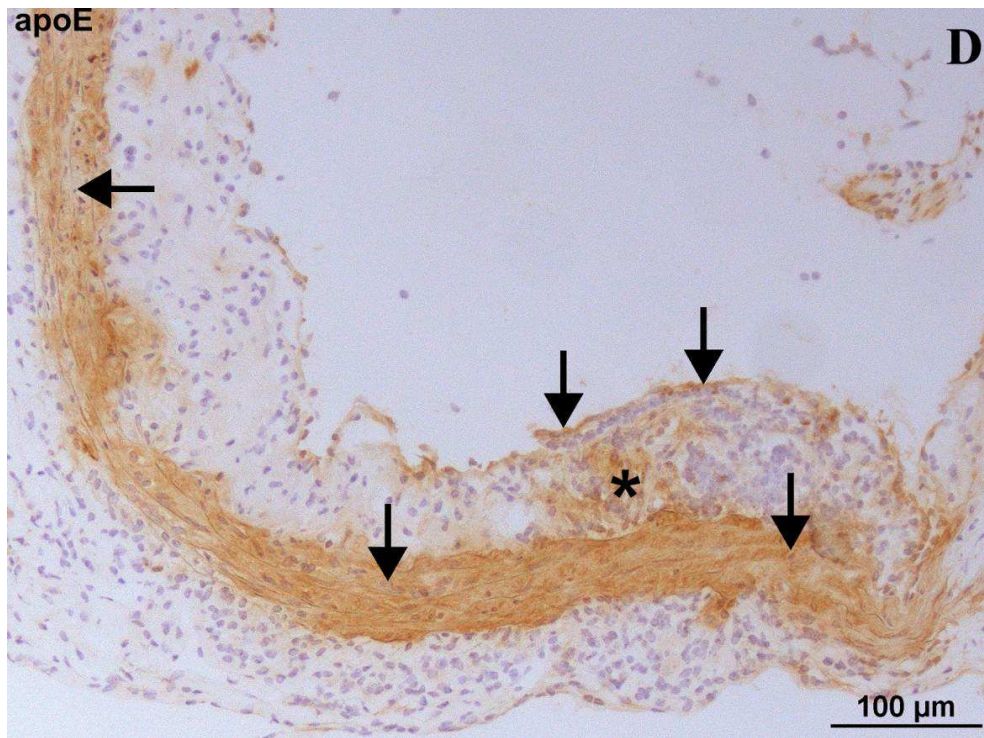


Obrázek: Expres VCAM-1 u apoE-deficientních myši v místech, kde nebyly přítomny aterosklerotické pláty. Expres VCAM-1 je detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.

Obrázek: Expres VCAM-1 u apoE-deficientních myší v místech, kde byly aterosklerotické pláty. Expres VCAM-1 je detekována na cévním endotelu plátu, mimo plát (A, B) a navíc ještě v oblasti cévní medie (šipky) (A, B, C, D). Dále je exprese také detekována v aterosklerotických plátech (hvězdička) (D). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.







6 DISKUZE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí (88).

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze jako pasivní lepidlo, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Adhezní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciaci, hojení ran, či obnova tkání (34).

Ig skupina adhezních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců. Z hlediska vztahu k aterogenezi jsou nejvýznamnější VCAM-1 a ICAM-1 (89).

V této diplomové práci jsme se zaměřili na sledování exprese VCAM-1 u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší v místech, kde nebyly nalezeny aterosklerotické pláty a v místech, kde se tyto pláty vyskytovaly, což platí samozřejmě pouze pro hypercholesterolemické apoE-deficientní myši. U těchto myší byla zcela v souladu s literaturou nelezena velmi vysoká hladina cholesterol v krvi v porovnání s kontrolním kmenem myší C57BL/6J (90). Z tohoto je zřejmé, že aterosklerotické pláty se mohou vyvinout pouze u těchto hypercholesterolemických myší.

Některé práce popsaly větší význam adhezní molekuly VCAM-1 v aterogenezi ve srovnání s jinými jako je např. ICAM-1. Inhibice aktivity VCAM-1 vedla ke snížení velikosti plátů u myší, což se nepotvrdilo u ICAM-1 (37). Dále se ukázalo, že exprese VCAM-1 není detekovatelná u normocholesterolemických králíků kdežto exprese ICAM-1 se u nich vyskytuje (41, 91). V této diplomové práci jsme ovšem našli expresi VCAM-1 na cévním endotelu i u normocholesterolemických C57BL/6J myší. To může znamenat, že u myší na rozdíl od králíků existuje jistá bazální exprese VCAM-1.

Podobně jsme také detekovali expresi VCAM-1 pouze na endotelu u apoE-deficientních myší v místech, kde nebyly přítomny aterosklerotické pláty. Po prozkoumání 24 řezů jsme překvapivě nezjistili výraznější rozdíly nicméně je nutno poznamenat, že nebyla provedena žádná kvantifikační analýza. Obecně je známo, že exprese VCAM-1 na endotelu je zásadní pro transmigraci monocytů do cévní intimy během aterogeneze (92) a proto je exprese u těchto myší soustředěna zejména do oblasti endotelu. Výrazná změna exprese VCAM-1 se objevila až u apoE-deficientních myší v místech, kde byly nalezeny pláty. Kromě exprese na cévním endotelu plátu i mimo něj byla exprese detekována také v cévní medii. Zde se jedná o expresi modifikovanými hladkými svalovými buňkami, které změnilly svůj fenotyp z kontraktilního na syntetický, což je zásadní z hlediska aterogeneze (55). Tyto hladké svalové buňky poté produkují složky extracelulární matrix, což přispívá k růstu plátu (41, 93). Toto tedy ukazuje na fakt, že až ve fázi rozvoje plátů se exprese VCAM-1 objevuje také v medii, kde před tím u normocholesterolemických myší nebo apoE myší bez plátu nebyla detekována.

Tato diplomová práce tedy jasně ukazuje změny exprese VCAM-1 během aterogeneze z hlediska lokalizace v cévní stěně a jasně tedy potvrzuje význam této adhezní molekuly v aterosklerotickém procesu.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi VCAM-1 ve stěně cévy u normocholesterolemických myší kmene C57BL/6J, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta a u hypercholesterolemických apoE-deficientních myší.

Biochemická analýza jednoznačně prokázala statisticky významný nárůst hladin celkového cholesterolu u apoE-deficientních myší ve srovnání s C57BL/6J kmenem.

V oblastech, kde nebyly přítomny žádné léze, byla exprese VCAM-1 detekována pouze na cévním endotelu aorty a to zhruba ve stejné intenzitě u C57BL/6J i apoE-deficientních myší.

U apoE deficientních myší, kde byly již přítomny aterosklerotické pláty, došlo ke změnám v expresi VCAM-1 ve stěně cévy. Kromě exprese na cévním endotelu plátu i mimo něj byla exprese pozorována také v aterosklerotických plátech a také v medii cév modifikovanými hladkými svalovými buňkami.

Tyto výsledky jasně ukazují změny exprese VCAM-1 během aterogeneze z hlediska lokalizace v cévní stěně a jasně tedy potvrzuje význam této adhezní molekuly v aterosklerotickém procesu.

8 SEZNAM ZKRATEK

ACEI	inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu
Apo E	apolipoprotein E
AK	aminokyselina
CMP	cévní mozková příhoda
DAB	diaminobenzidin
HDL	high density lipoprotein
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule-1
IDL	intermediate density lipoprotein
Ig	imunoglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
KT	krevní tlak
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	leukocytární funkční antigen-1
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MMP	matrixová metaloproteináza
NF- κ B	nukleární faktor- κ B
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PSGL-1	P-selektin glykoprotein ligand
TGF- β	transformující růstový faktor- β
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4
VLDL	very low density lipoprotein

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. ÚZIS [online] 22.7.2011 [cit. 8.8.2011]. Zemřelí 2010. Dostupné z [www: http://www.uzis.cz/publikace/zemreli-2010](http://www.uzis.cz/publikace/zemreli-2010).
2. WHO [online] 20.1.2011 [cit. 8.8.2011]. Estimated Proportional Mortality (%), Czech republic, 2004. Dostupné z [www: http://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx](http://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx).
3. VOKURKA, M., HUGO, J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. 6. vyd., Praha: Maxdorf, 2006, s. 1017. ISBN 80-7345-105-0.
4. VLČEK, J., FIALOVÁ, D. a kol.: *Klinická farmacie I*. 1.vyd., Praha: Grada Publishing, 2010, s. 368. ISBN 978-80-247-3169-8.
5. ŠTULC, T.: *Aterogeneze a její patogenetické mechanismy*. Kardiologické fórum, 2006, 4, s.14-15.
6. KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L.: *Funkční histologie*. 2.vyd., Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o., 2000, s.291. ISBN 80-86022-80-3.
7. POVÝŠIL, C., ŠTEINER, I. a kol.: *Speciální patologie*. 2.vyd., Galén, 2007, s. 430. ISBN 978-80-7262-494-2.
8. http://www.as.miami.edu/chemistry/2086/chapter_21/NEW-Chap21_class_part1_files/image001.jpg (5.2.2011)
9. ČIHÁK, R.: *Anatomie 3*. 2.vyd., Grada Publishing, 2004, s.692. ISBN 80-247-1132-X.
10. UDEL [online] [cit. 6.3.2011]. *Capillaries*. Dostupné z [www: http://www.udel.edu/biology/Waqs/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/capillaries.html](http://www.udel.edu/biology/Waqs/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/capillaries.html)
11. http://www.as.miami.edu/chemistry/2086/chapter_21/NEW-Chap21_class_part1_files/image004.jpg (5.2.2011)

12. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J.: *Patologie*. 1.vyd., Grada Publishing, 2004, s. 348. ISBN 80-247-0785-3.
13. OŠŤÁDAL, B., VÍZEK, M. A kol.: *Patologická fyziologie srdce a cév*. 1.vyd., Karolinum, 2003, s. 168. ISBN 80-246-0597-X.
14. http://www.laddmcnamara.com/assets/images/vascular_inflammation.jpg (9.8.2011)
15. MYŚLIWIEC, M., BORAWSKI, J., NAUMNIK, B., RYDZEWSKA-ROSOŁOWSKA, A.: *Endothelial dysfunction, atherosclerosis and trombosis in uremia- possibilities of intervention*. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 2004, 49, p. 151-156.
16. ČEŠKA, R., ŠNAJDRLOVÁ, M. *Zdravotnické noviny* [on line]. 17.4.2008 [cit. 8.8.2011]. Ženy, lipidy a ateroskleróza: naděje, kontroverze, zklamání, ale i přísliby do budoucna. Dostupné z [www: http://www.zdn.cz/clanek/postgraduální-medicína-priloha/zeny-lipidy-a-ateroskleróza-naděje-kontroverze-zklamání-ale-i-pr-360485](http://www.zdn.cz/clanek/postgraduální-medicína-priloha/zeny-lipidy-a-ateroskleróza-naděje-kontroverze-zklamání-ale-i-pr-360485).
17. ŠTEJFA, M. a kol.: *Kardiologie*. 3. vyd., Grada Publishing, 2007, s. 722. ISBN 978-80-247-1385-4
18. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J.: *Biochemie pro studující medicíny*. 1.vyd., Karolinum, 2006, s. 562. ISBN 80-246-0851-0.
19. http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2008_Groups/group06/Images/LD_L.jpg (9.8.2011)
20. MESTAS, J., LEY, K.: *Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2008, 18, 6, p. 228–232.
21. DAVIGNON, J., GANZ, P.: *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. *Circulation*, 2004, 109, III-27-III-32.
22. GALKINA, E., LEY, K.: *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, 27, p. 2292-2301.

23. MYŚLIWIEC, M., BORAWSKI, J., NAUMNIK, B., RYDZEWSKA-ROSOŁOWSKA, A.: *Endothelial dysfunction, atherosclerosis and trombosis in uremia- possibilities of intervention. Rocz. Akad. Med. Białymst., 2004, 49, p. 151-156.*
24. <http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/images/nature01323-f1.2.jpg> (9.8.2011)
25. <http://www.jlr.org/content/50/Supplement/S352/F2.large.jpg> (9.8.2011)
26. <http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/images/nature01323-f2.2.jpg> (9.8.2011)
27. <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/files/qicd/athero.jpg> (9.8.2011)
28. <http://heart.bmj.com/content/92/11/1557/F1.large.jpg> (9.8.2011)
29. MAREČKOVÁ, Z., HELLER, S., HORKÝ, K.: *Buněčné adhezivní molekuly a jejich úloha v patofyziologických dějích. Vnitř. Lék., 1999, 45, 1, s. 46-50.*
30. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/CellAdhesion/camfamilies.gif> (9.8.2011)
31. DREßLER, J., STREJC, P., KLÍR, P., MÜLLER, E., BOUBELÍK, O., GROSSOVÁ, I.: *K časovým relacím exprese adhezivních bílkovin a dalších markerů stáří poranění. Soud. Lék., 2002, 47, 3, s. 38-42.*
32. <http://www.nature.com/nri/journal/v7/n6/images/nri2096-i1.jpg> (9.8.2011)
33. ZHANG, J., ALCAIDE, P., LIU, L., SUN, J., HE, A., LUSCINSKAS, FW., SHI, GP.: *Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Mast Cells, Macrophages, and Neutrophils. PLoS ONE, 2011, 6, 1, e14525.*
34. KRIEGLSTEIN, CF., GRANGER, DN.: *Adhesion molecules and their role in vascular disease. Amer. J. Hypertens., 2001, 14, p. 44–54.*

35. LI, G., SANDERS, JM., PHAN, ET., LEY, K., SAREMBOCK, IJ.: Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Amer. J. Pathol.*, 2005, 167, 6, p. 1511-1518.
36. MESTAS, J., LEY, K.: Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2008, 18, 6, p. 228-232.
37. CYBULSKY, MI., IYAMA, K., LI, H., ZHU, S., CHEN, M., IYAMA, M., DAVIS, V., GUTIERREZ-RAMOS, JC., CONNELLY, PW., MILSTONE, DS.: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 10, p. 1255-1262.
38. LESSNER, MS., PRADO, HL., WALLER, EK., GALIS, ZS.: Atherosclerotic Lesions Grow Through Recruitment and Proliferation of Circulating Monocytes in a Murine Model. *Amer. J. Pathol.*, 2002, 160, 6, p. 2145–2155.
39. NACHTIGAL, P., KOPECKY, M., SOLICHOVA, D., ZDANSKY, P., SEMECKY, V.: The changes in the endothelial expression of cell adhesion molecules and iNOS in the vessel wall after the short-term administration of simvastatin in rabbit model of atherosclerosis. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, 57, 2, p. 197-203.
40. AIRD, William: *Endothelial Biomedicine*. [s.l.] : Cambridge University Press, 2007, p. 1894. ISBN 978-0-521-85376-7.
41. LEY, K., HUO, Y.: VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 10, p. 1209-1210.
42. BRAUN, M., PIETSCH, P., SCHROR, K., BAUMANN, G., FELIX, SB.: Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.*, 1999, 41, 2, p. 395-401.
43. LEUNG, K.: VCAM-1 internalizing peptide-28 nanoparticles. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [online]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2004-2010. [cit. 17. července 2011]. Dostupné z www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641476>.

44. PRADHAN, AD., RIFAI, N., RIDKER, PM.: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1, Soluble Vascular Adhesion Molecule-1, and the Development of Symptomatic Peripheral Arterial Disease in Men. *Circulation*, 2002, 106, 7, p. 820-825.
45. HASTINGS, NE., FEAVER, RE., LEE, MY., WAMHOFF, BR., BLACKMAN, BR.: Human IL-8 Regulates Smooth Muscle Cell VCAM-1 Expression in Response to Endothelial Cells Exposed to Atheroprone Flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, 29, 5, p. 725-731.
46. MATHEW, M., TAY, E., CUSI, K.: Elevated plasma free fatty acids increase cardiovascular risk by inducing plasma biomarkers of endothelial activation, myeloperoxidase and PAI-1 in healthy subjects. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2010, 9, 9, p. 1-9.
47. NYLÆNDE, M., KROESE, A., STRANDEN, E., MORKEN, B., SANDBÆK, G., LINDAHL, AK., ARNESEN, H., SELJEFLOT, I.: Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc. Med.*, 2006, 11, 1, p. 21-28.
48. <http://www.nature.com/nri/journal/v7/n9/images/nri2156-f1.jpg> (9.8.2011)
49. PEPINSKY, Blake, et al. Structure/Function Studies on Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 25, p. 17820-17826.
50. <http://www.jleukbio.org/content/83/1/1/F2.expansion.html> (9.7.11)
51. HUBBARD, Andrea K.; ROTHLEIN, Robert . Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28, 9, s. 1379-1386. Převzato z Aird, 2007.
52. DANSKY, HM., BARLOW, CB., LOMINSKA, C., SIKES, JL., KAO, C., WEINSALT, J., CYBULSKY, MI., SMITH, JD.: Adhesion of Monocytes to Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Dosage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, 21, 10, p. 1662-7.

53. <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3395/fig2.jpg> (9.8.2011)
54. KARÁSEK, D., VAVERKOVÁ, H., HALENKA, M., BUDÍKOVÁ, M., NOVOTNÝ, D.: Soluble cell adhesion molecules sVCAM-1 and sICAM-1 in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Biomed. Papers*, 2005, 149, 1, p. 101-108.
55. MOISEEVA, EP.: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their function.. *Cardiovasc. Res.*, 2001, 52, 3, p. 372-386.
56. JANG, Y., LINCOFF, M., PLOW, EF., TOPOL, EJ.: Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J. Amer. Coll. Cardiol.*, 1994, 24, 7, p. 1591–1601. Převzato z Braun et al., 1999.
57. HONGMEI, L., CYBULSKY, MI., GIMBRONE, MA., LIBBY, P.: Inducible expression of VCAM-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am. J. Pathol.*, 1993, 143, 6, p. 1551-1559.
58. SHEPPARD, AM., ONKEN, MD., ROSEN, CD., NOAKES, PG., DEAN, DC.: Expanding Roles for $\alpha 4$ Integrin and its Ligands in Development. *Cell Commun. Adhes.*, 1994, 2, 1, p. 27-43. Převzato z Braun et al., 1999.
59. PRINTSEVA, OY., PECLO, MM., TJURMIN, AV., GOWN, AM.: A 90-kDa surface antigen of immature smooth muscle cells is ICAM-1. *Am. J. Physiol.*, 1991, 261, 4, p. 21–22. Převzato z Braun et al., 1999.
60. DULPAA, C., COUFFINHAL, T., DUFOURCQ, P., LLANAS, B., MOREAU, C., BONNET, J.: The integrin very late antigen-4 is expressed in human smooth muscle cell. *Circ. Res.*, 1997, 80, 2, p. 159–169. Převzato z Braun et al., 1999.
61. ARDEHALI, A., LAKS, H., DRINKWATER, DC., ZIV, E., DRAKE, TA.: Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*, 1995, 92., 3, p. 450–456. Převzato z Braun et al., 1999.

62. OWENS, GK.: *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. Physiol. Rev.*, 1995, 75, 3, p. 487–517. Převzato z Braun et al., 1999.
63. CUFF, CA., KOTHAPALLI, D., AZONOB, I., CHUN, S., ZHANG, Y., BELKIN, R., YEH, C., SECRETO, A., ASSOIAN, RK., RADER, DJ., PURÉ, E.: *The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. J. Clin. Invest.*, 2001, 108, 7, p. 1031-1040.
64. <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/52/3/372/F1.medium.gif>
(10.7.11)
65. LIBBY, P., LI, H.: *Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherosclerosis. J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 2, p. 538–539. Převzato z Braun et al., 1999.
66. BRAUN-DULLAEUS, RC., MANN, MJ., LEYEN, HE., SHERWOOD, SW., DZAU, VJ.: *Evidence for cell cycle-dependent phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. Circulation*, 1996, Suppl., I, 285.
67. HANSSON, GK., HOLM, J., JONASSON, L.: *Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. Am. J. Pathol.*, 1989, 135, 1, p. 169–175. Převzato z Braun et al., 1999.
68. RUS, HG., NICULESCU, F., VLAICU, R.: *Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. Atherosclerosis*, 1991, 89, p. 247–254. Převzato z Braun et al., 1999.
69. MOYER, DF., SAJUTHI, D., TULLI, H., WILLIAMS, JK.: *Synthesis of IL-1 α and IL-1 β by arterial cells in atherosclerosis. Am. J. Pathol.*, 1992, 138, 4, p. 951–960. Převzato z Braun et al., 1999.
70. NILSSON, J.: *Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. Cardiovasc. Res.*, 1993, 27, p.1184–1190. Převzato z Braun et al., 1999.

71. BRAUN, M., PIETSCH, P., FELIX, SB., BAUMANN, G.: *Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines*. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1995, 27, 12, p. 2571–2579. Převzato z Braun et al., 1999.
72. BRAUN, M., HOHLFELD, T., KIENBAUM, P., WEBER, AA., SARBIA, M., SCHRÖR, K.: *Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits*. *Atherosclerosis*, 1993, 103, 1, p. 93–105. Převzato z Braun et al., 1999.
73. THORNE, SA., ABBOT, SE., STEVENS, CR., WINYARD, PG., MILLS, PG., BLAKE, DR.: *Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 1996, 127, 2, p. 167–176. Převzato z Braun et al., 1999.
74. GERTHOFFER, WT., SINGER, CHA.: *Secretory Functions of Smooth Muscle: Cytokines and Growth Factors*. *Mol. Interventions*, 2002, 2, 7, p. 447-456.
75. VAN Seventer, GA., NEWMAN, W., SHIMIZU, Y. et al.: *Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1*. *J. Exp. Med.*, 1991, 174, p. 901–913. Převzato z Braun et al., 1999.
76. LEE, RT., LIBBY, P.: *The unstable atheroma*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, 17, p. 1859–1867. Převzato z Braun et al., 1999.
77. <http://molinterv.aspetjournals.org/content/2/7/447/F2.expansion.html> (9.8.2011)
78. FRUEBIS, J., SILVESTRE, M., SHELTON, D., NAPOLI, D., PALINSKI, W.: *The inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits*. *Journal of Lipid Research*, 1999, 40, p. 1958-1966.
79. ISHIBASHI, S., HERZ, J., MAEDA, N., GOLDSTEIN, JL., BROWN, MS.: *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in „knockout“ mice lacking*

the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1994, 91, p. 4431- 4435. Převzato z Nachtigal et al., 2008.

80. NACHTIGAL, P., POSPISILOVA, N., JAMBOROVA, G., POSPECHOVA, K., SOLICHOVA, D., ANDRYS, C., ZDANSKY, P., MICUDA, S., SEMECKY, V.: *Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. Life Sci., 2008, 13-14, p. 708-717.*
81. DE CATERINA, R., MANES, C.: *Inflammation in early atherogenesis: impact of ACE inhibition. Eur. Heart J. Supplements, 2003, 5, p. 15-24.*
82. JABOR, A. a kol.: *Vnitřní prostředí. 1. vyd., Grada Publishing, 2008, s. 560. ISBN 978-80-247-1221-5.*
83. JAWIEN, J., NASTALEK, P., KORBUT, R.: *Mouse models of experimental atherosclerosis. J. Physiol. Pharmacol., 2004, 55, 3, p. 503-517.*
84. ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., DE VRIES-VAN DER WEIJ, J., VAN DER HOORN, J., PRINCEN, H.M., KOOISTRA, T.: *Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2007, 27, p. 1706-1721.*
85. BIOPROJEKTY [online] [cit. 9.8.2011]. Využití modelových organismů pro studium lidských onemocnění (myší modely). Dostupné z [www: http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/misi-modely.pdf](http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/misi-modely.pdf).
86. MEIR, K.S., LEITERSDORF, E.: *Atherosclerosis in the apolipoprotein E- deficient mouse: a decade of progress. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2004, 24, p. 1006-1014.*
87. CARMELIET, P., MOONS, L., COLLEN, D.: *Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. Cardiovas. Res., 1998, 39, 1, p. 8-33.*
88. FRANGOS, S.G., GAHTAN, V., SUMPIO, B.: *Localization of atherosclerosis: role of hemodynamics. Arch. Surg., 1999, 134, p. 1142-1149.*

89. PRICE, DT., LOSCALZO, J.: *Cellular adhesion molecules and atherogenesis*. *Am. J. Med.*, 1999, 107, p. 85-97.
90. NAKASHIMA, Y., PLUMP, AS., RAINES, EW., BRESLOW, JL., ROSS, R.: *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. *Arterioscler. Thromb.*, 1994, 14, p.133-140.
91. NACHTIGAL, P., SEMECKY, V., KOPECKY, M., GOJOVA, A., SOLICHOVA, D., ZDANSKY, P., ZADAK, Z.: *Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis*. *Pathol. Res. Pract.*, 2004, 200, p. 219-229.
92. ALON, R., KASSNER, PD., CARR, MW., FINGER, EB., HEMLER, ME., SPRINGER, TA.: *The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1*. *J. Cell. Biol.*, 1995, 128, p. 1243-1253.
93. VLASSARA, H., FUH, H., DONNELLY, T., CYBULSKY, M.: *Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits*. *Mol. Med.*, 1995, 1, p. 447-456.